

| | | |
|---|-----------|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : G01N 33/58, 33/53, 21/76 G01N 33/543, 33/548, 33/538 G01N 33/52, 21/64 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/21530 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Oktober 1993 (28.10.93) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01115 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Mai 1992 (20.05.92) (30) Prioritätsdaten: P 42 12 148.5 10. April 1992 (10.04.92) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MES- SERSCHMITT-BÖLKOW-BLOHM GMBH [DE/DE]; Robert-Koch-Straße, D-8012 Ottobrunn (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : CAMMANN, Karl [DE/ DE]; Akazienstr. 1, D-4400 Münster (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE). | | Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelasse- nen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderun- gen eintreffen.</i> |
| <p>(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR INCREASING THE SENSITIVITY AND SELECTIVITY OF IMMUNO-ASSAYS, MOLECULE-RECEPTOR, DNA-COMPLEMENTARY DNA and FOREIGN MOLECULE-HOST MOLECULE INTERACTION ASSAYS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR EMPFINDLICHKEITS- UND SELEKTIVITÄTSSTEIGERUNG BEI IMMUNO-ASSAYS, MOLEKÜL-REZEPTOR-, DNA-KOMPLEMENTÄR-DNA- UND GAST-WIRTSMOLEKÜL-WECHSELWIRKUNGS-ASSAYS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A process is disclosed for carrying out particularly sensitive immuno-assays and other assays that rely on molecule-receptor, DNA strand-complementary DNA strand and foreign molecule-host molecule interaction forces, with rapid and repetitive measurements of the current density or fluorescent light and double measurement and comparison/quotient calculation in at least two measurement zones or calibration in an analogue manner to the inner standard method, by using stable redox or IR-fluorescence marked analyte molecules in immuno-assays and the like.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verfahren zur Durchführung besonders empfindlicher Immuno-Assays und weiteren Assays, die auf Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA-Strang- sowie Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungskräften beruhen, mit schnellen und repetitiven Messungen der Stromstärke oder des Fluoreszenzlichtes und Doppelmessung und Vergleich/Quotientenbildung in mindestens zwei Meßzonen bzw. Kalibrierung analog der Methode des inneren Standards, unter Verwendung stabiler redox- oder IR-fluoreszenzmarkierter Analytmoleküle bei Immuno-Assays und ähnlichen Assays.</p> <div data-bbox="1047 1312 1583 1837" data-label="Diagram"> </div> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich | FR | Frankreich | MR | Mauritanien |
| AU | Australien | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GB | Vereinigtes Königreich | NL | Niederlande |
| BE | Belgien | GN | Guinea | NO | Norwegen |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | NZ | Neuseeland |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | PL | Polen |
| BJ | Benin | IE | Irland | PT | Portugal |
| BR | Brasilien | IT | Italien | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | JP | Japan | RU | Russische Föderation |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SD | Sudan |
| CG | Kongo | KR | Republik Korea | SE | Schweden |
| CH | Schweiz | KZ | Kasachstan | SK | Slowakische Republik |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LK | Sri Lanka | SU | Sowjet Union |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TD | Tschad |
| CZ | Tschechische Republik | MC | Monaco | TG | Togo |
| DE | Deutschland | MG | Madagaskar | UA | Ukraine |
| DK | Dänemark | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| ES | Spanien | MN | Mongolei | VN | Vietnam |
| FI | Finnland | | | | |

Verfahren und Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays

Die Erfindung richtet sich auf ein allgemein anwendbares Verfahren, das aus einer Kombination ausgewählter Schritte besteht und Vorrichtungen für extrem empfindliche und ungestörte Konzentrationsbestimmungen beliebiger Antikörper-Antigenpaar, komplementärer Molekül-Rezeptorpaare, komplementärer DNA-Stränge sowie selektiver Gast-/ Wirtsmolekülpaare. Ferner betrifft sie eine Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays.

Die quantitative Analyse komplexer Stoffgemische unter Ausnutzung der sehr selektiven Antikörper-Antigen-Bindung (Schlüssel-Schloß-Prinzip) und der DNA-Paarbildung bei den sog. DNA-Sonden ist in der Biochemie und klinischen Chemie eine etablierte Analysenmethode und dementsprechend weit verbreitet. Meist werden kompetitive Tests mit markierten Antigenen, Antikörpern oder DNA-Molekülen benutzt. Beim Radio-Immuno-Assay (RIA) ist das der Meßlösung zugesetzte Antigen (bzw. das Antikörpermolekül bei der Sandwich-Methode) radioaktiv markiert. Beim Enzym-Immuno-Assay (EIA oder das heterogene Enzym-Linked-Adsorbend-Assay, ELISA) ist an den betreffenden Markermolekülen ein sog. Marker-Enzym gebunden. Diese markierten Moleküle konkurrieren mit den zu messenden, unmarkierten Molekülen (zu bestimmender Stoff - Analyt) um die Bindung an den meist trägergebundenen Antikörper (bzw. DNA-Sequenz), so daß sich die unbekannte Menge Antigen (DNA-Art und Menge) bestimmen läßt, wenn zum Ver-

SUBSTITUTE SHEET

2

gleich ein Test mit einem Antigen (DNA-Molekül) bekannter Konzentration durchgeführt wird. Die Meßsignale sind bei dieser Methode umgekehrt proportional zur Konzentration. Bei den sog. Sandwichtests werden markierte Antikörper benutzt. Diese binden sandwichartig an Antigenmoleküle an, die ihrerseits zuvor konzentrationsabhängig an trägergebundene Antikörper gebunden sind.

Die sehr spezifische Bindung zweier komplementärer Moleküle erlaubt natürlich auch umgekehrt die quantitative Bestimmung des größeren Partners (Antikörper-, Rezeptor-Analyse resp. des komplementären DNA-Moleküls (oder Bio-Oberfläche), welches mindestens in einem Teilbereich eine komplementäre DNA-Sequenz zur markierten Sequenz aufweist) und sind daher die wichtigsten biochemischen Analysenverfahren. Nachdem es inzwischen möglich ist, auch für kleinere Moleküle (Haptene) monoklonale Antikörper in beliebigen Mengen zu produzieren, werden diese immunologischen Methoden auch für die Umweltanalytik zunehmend bedeutsam. Beispielsweise kann man unter Verwendung monoklonaler Antikörper für die verschiedenen Dioxine die gesamten Analysenkosten dadurch erheblich senken, daß nur bei positivem Ergebnis des immunologischen Tests die sehr teure GC-MS Analyse durchgeführt werden muß (Screening).

Die inzwischen traditionellen immunologischen Bestimmungsverfahren (RIA und EIA bzw. ELISA) weisen erhebliche Nachteile auf, die hinlänglich bekannt sind. Entweder treten wegen der Verwendung radioaktiven Materials Entsorgungs-, Versand- und Lagerprobleme auf oder man muß mit einer Beeinflussung der immunologischen Reaktion durch das meist, verglichen zum relativ kleinen Antigenmolekül, voluminöse Enzymmolekül rechnen. Enzymmarkierte Antigen- oder Antikörpermoleküle (bzw. eines der Partner von Molekül-Rezeptor-, Gast-Wirtsmolekül-, DNA-komplementär DNA-Wechselwirkungsmethoden) weisen alle Nachteile enzymatischer Verfahren auf. Die Lebensdauer des Enzyms ist begrenzt und die enzymatische Reaktion (Biokatalyse) kann bei unbekannten Umweltmatrices durch Inhibitoren oder Enzymgifte (z.B. Schwermetalle) empfindlich gestört werden, so daß falsche Ergebnisse auftreten. Meist muß die enzymmarkierte Verbindung aus Stabilitätsgründen kühl gelagert werden. Wegen dieser abnehmenden Aktivität

sind zusätzliche Kalibrierschritte erforderlich und die GLP-Richtlinien (Gute Labor Praxis), die bei quantitativen Analysen eingehalten werden müssen, erfordern durch Rückstellproben eine Menge der teureren Enzym-markierten Verbindungen. Auch ist eine Phasentrennung erforderlich, ein Substrat muß zugegeben werden, wodurch die Handhabung sehr kompliziert wird. Die erforderlichen Arbeitsschritte benötigen i.d.R. einige Stunden. Ohne Phasentrennung laufen die sog. homogenen Enzym-Immuno-Assays (EMIT) ab, die kompetitiv arbeiten und sich nur für kleine Antigenmoleküle eignen.

Über eine einfache und allgemein anwendbare analytisch-chemische Ausnutzung selektiver Molekül-Rezeptor Wechselwirkungskräfte, DNA-Paarbildungsreaktionen sowie der gleichermaßen selektiven Gast-Wirtsbeziehungen der supramolekularen Chemie zum Zwecke einer quantitativen Bestimmung oder gar zum Aufbau von entsprechenden Sensoren existieren nur wenige Vorarbeiten.

Der vorteilhafte Aufbau eines einfachen und preiswerten elektrochemischen Meßsystems, das in Form der Potentiometrie oder Amperometrie den geringsten apparativen Aufwand erfordert, scheitert in der Regel daran, daß der zu bestimmende Stoff (Analyt) nicht als potentialbestimmendes Ion, sondern als neutrales Molekül vorliegt bzw. nicht elektrochemisch selektiv umgesetzt werden kann. Die Verwendung optischer Methoden (Spektralphotometrie, Fluoreszenzmessung, Ellipsometrie, Surface Plasmon Resonance Spektroskopie, Methode der evaneszenten Welle, usw.) zur Erfassung der oben erwähnten spezifischen Molekül-Wechselwirkungen ist beschrieben worden. Einige können die immunologische Reaktion auch ohne markierten Partner aufgrund der Änderung des Brechungsindex an einer Phasengrenze erfassen, haben aber große Probleme bei kleinen Analytmolekülen (wie in der Umweltanalytik üblich) im Spurenbereich (< 1 ppm), da die nichtspezifische Bindung von störenden Begleitstoffen, die sogar meist in einem großen Überschuß neben dem Analyten in einer realen Probe mitanwesend sind, empfindlichkeitslimitierend ist.

4

Optische Verfahren mit den üblichen Fluoreszenzmarkern, die eine Anregungswellenlänge im UV oder sichtbaren Bereich erfordern, benötigen einen hohen apparativen Aufwand, der einer weitverbreiteten Routineanwendung im Wege steht. Der Aufwand zur Stabilisierung der Lichtquelle, zur Monochromatisierung mittels eines streulichtfreien Monochromators, zur Vermeidung von Fremdlichteinflüssen, zur Empfindlichkeitssteigerung etc. erfordert apparative Aufbauten, die sehr komplex und damit teuer sind. Außerdem werden neben den fluoreszierenden Molekülgruppen des Markers auch viele Stoffe in typisch biologischen Matrices mitangeregt (z.B. Tryptophan u.a.), so daß ihre Fluoreszenz nicht von der des Markermoleküls unterschieden werden kann, was die Nachweisgrenze extrem verschlechtert. Lediglich die Markierung mittels spezieller Fluoreszenzmarker, die nach der Methode der zeitverzögerten Fluoreszenz arbeiten, kann diese Probleme umgehen. Diese Methode benötigt aber teurere Geräte und wird praktisch nur mittels sog. Enhancement-Schritte zur Steigerung der Empfindlichkeit durchgeführt, was aber einen zusätzlichen Arbeitsgang bedeutet.

In der deutschen Patentanmeldung DE 3916432 A1 von 1990 wird ein potentiometrisches Verfahren zur Detektion einer Immuno-Reaktion zwischen unmarkierten komplementären Partnern beschrieben, welches aber ebenfalls bei kleineren Analytmolekülen in einem Bereich unter 1 ppm anwendbar ist.

Bei Immuno-Assays, die wie die Affinitätschromatographie betrieben werden und bei denen eine Verdrängungsreaktion mit einem markierten Analytmolekül ausgenutzt wird, beschreibt der Stand der Technik bisher nur Messungen mittels Durchflußmeßzellen, bei denen die Wechselwirkungszeit (=reine Meßzeit) mit den messenden Größen (Licht, Strom etc.), durch die Strömungsgeschwindigkeit vorgegeben, relativ kurz (nur wenige Sekunden) ist. Eine derartig kurze Meßzeit erlaubt vor allem bei Durchflußmessungen keine hohe elektronische Dämpfung. Daher sind der elektronischen oder optoelektronischen Verstärkungstechnik durch das in den empfindlichsten Bereichen stark abfallende Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R-Verhältnis) Grenzen gesetzt. Ebenfalls unmöglich sind bei dem schnellen Durchströmen der markierten Substanz durch den Durchfluß-De-

ERSATZBLATT

tektor Wiederholmessungen, die sich bei Mittelwertbildung ähnlich positiv auf das S/R-Verhältnis auswirken. Darüber hinaus benötigen Wiederholmessungen einen Bezugspunkt, d.h. eine Untergrundmessung (Blindwertmessung oder engl. blanc value), die eine entsprechende Vorrichtung verlangt.

Über eine einfache und quasi automatische Abtrennung der ebenfalls aus der immunologischen Reaktionszone austretenden Probenmatrix mit störenden Komponenten wird außer im Zusammenhang mit den heterogenen ELISA-Techniken, die einen zusätzlichen Abtrennungsschritt vorschreiben, im Stand der Technik nichts berichtet. Dies ist aber für richtige Messungen von zentraler Bedeutung und unabdingbare Voraussetzung bei repetitiven Messungen, bei denen sich natürlich Fehlmessungen ebenfalls addieren.

Eine Gleichstellung von Immunoreaktionen mit Rezeptorreaktionen bzw. DNA-Paarbildung und molekülerkennenden Gast-/Wirtsmolekül-Einlagerungen bezüglich der erfindungsgemäßen, allgemein gültigen, sensorisch ausnutzbaren Anordnung wurde bisher nicht beschrieben, da die Markierung mit einem voluminösen Enzym diese selektiven Bindungsreaktionen sehr stark behindert (sterische Behinderung). Dies ist bei den relativ kleinen Redox-Systemen oder IR-fluoreszierenden Molekülen nicht der Fall.

Es besteht daher ein Bedürfnis für ein generell anwendbares Verfahren und eine Vorrichtung, die die bekannten Nachteile der direkt anzeigenden und auch der mit markierten immunologischen Partnern ablaufenden Verfahren (alle derzeitigen Immuno-Assays) vermeidet.

Die Aufgabe der Erfindung, die Empfindlichkeit zu erhöhen bei gleichzeitiger Verminderung der bekannten Querstörungen aller traditionellen Immuno-Assays und ähnlicher Verfahren, wird erreicht insbesondere durch die ausgewählte Kombination von mehreren Verfahrensschritten gemäß Anspruch 1. Zur Erzielung der geforderten extrem niedrigen Nachweisgrenze im Spurenanalysenbereich werden erfindungsgemäß anstelle der anfälligen und ungenauen enzymatischen Signal-Verstärkungsmethoden repetitierbare elektrochemische und optische Meßmethoden zusammen mit einer speziellen

elektronischen Signalaufbereitung (Signal-Mittelwertsbildung) und entsprechenden Meßanordnungen angewandt.

Der zu bestimmende Immuno-Partner (Antigen oder Antikörper, Molekül oder dazugehöriger Rezeptor, Gastmolekül oder dazugehöriges Wirtsmolekül, DNA-Strang und dazugehörige komplementäre Sequenz) wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren entweder mit einem stabilen Redox-System oder einer stabilen, im Infrarotbereich ($> 700 \text{ nm}$) fluoreszierenden Verbindung haltbar (z.B. kovalent gebunden) verbunden. Die Auswahl dieser beiden Marker-Molekülsorten erfolgte nach umfangreichen Vorversuchen und an Hand bestimmter Kriterien, die hiermit offenbart werden. Als Redox-Systeme eignen sich vorzugsweise anorganische oder organische Systeme mit hohen Standardaustauschstromdichten an inerten Metallelektroden. Bei den Fluoreszenz-Markern sind Moleküle, die mit preiswerten Laserdioden zur Fluoreszenz im fernen Infrarot ($> 800 \text{ nm}$) angeregt werden können, die vorteilhaftesten Markermoleküle.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist einfacher, empfindlicher, schneller, richtiger und daher letztendlich auch preiswerter als alle bisher beschriebenen Immuno-Assays. Vorteilhafter ist auch die direkte, extrem empfindliche und schnelle Erfassung von kleineren Antigenen, die nach den oben erwähnten Offenlegungsschriften mit den dort beschriebenen Verfahren nur mangelhaft oder überhaupt nicht möglich ist. Gerade hier existiert aber ein großer Anwendungsbereich für die neue Molekülanalytik (Schadstoffanalytik) vor allem im Bereich des Umweltschutzes oder der Überwachung von maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen sowie der klinischen Chemie (medizinischen Diagnose, Pathologie, Gerichtsmedizin).

Das erfindungsgemäße Verfahren kann unterschiedlich durchgeführt werden:

In einer vorteilhaften Version wird das markierte Analytmolekül zuvor an dem immobilisierten Partner gebunden. Das unmarkierte Analytmolekül in der Probe verdrängt bei Kontakt mit den gebundenen, markierten Partnern sein markiertes Gegenstück (redox- oder fluoreszenzmarkiertes Antigen- oder Antikörpermolekül = markiertes Analytmolekül) aus der Oberflä-

chenbindung, welches dann durch eine Flüssigkeitsströmung wegtransportiert wird.

In einer anderen Version wird der Probe das markierte Analytmolekül in einem bekannten Verhältnis zugesetzt und man läßt die Mischung mit den immobilisierten Immuno-Partnern (worunter alle oben erwähnten komplementären Systeme zu verstehen sind) in Wechselwirkung treten. Je nach der Konzentration des Analyten werden unterschiedliche Mengen des markierten Analytmoleküls kompetitiv gebunden, wobei eine umgekehrte Relation besteht. Bei beiden Versionen werden die nichtgebundenen oder freigesetzten markierten Analytmoleküle auf kleinstem Raum wieder mittels des betreffenden immunologischen (komplementären) Partners, der immobilisiert oder örtlich begrenzt und fixiert vorliegt, gesammelt, aufkonzentriert und durch Spülen von anhaftender Probenmatrix gereinigt.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei der eine elektrochemisch und optisch zugängliche Oberfläche vorliegt, kann aber auch der Teil vermessen werden, der nicht der Eluatsammlung entspricht. Beim kompetitiven Test, bei dem die Oberfläche der Vorrichtung vor Kontakt mit der Probe mit immobilisierten Partnermolekülen bedeckt ist, die mit ihrem markierten Komplementärmolekül abgesättigt sind, kann auch die Abnahme der Intensität der Markierung gemessen werden, die der Analytmenge proportional ist. Bei dem anderen kompetitiven Test, bei dem markierte und unmarkierte Analytmoleküle zusammen zu den immobilisierten Komplementärmolekülen, die freie Bindungsstellen haben, zugesetzt werden, ist die Zunahme an markierten Molekülen in diesem Oberflächenbereich der Konzentration des Analyten umgekehrt proportional. Hier ist die Menge der markierten Moleküle, die die immunogene Zone ungebunden passieren, der Analytmenge direkt proportional. Bei der Messung zugänglichen Oberflächen kann man also bei einer derartigen immunologisch-analytischen Vorrichtung das Analysenergebnis doppelt (redundant) erhalten. Diese zweifache Bestimmungsmöglichkeit ist neu und verbessert die Zuverlässigkeit des gesamten Immuno-Assays erheblich. Fehler und Störungen können durch die mangelnde Übereinstimmung dieser beiden Meßwerte sofort erkannt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren läuft auf eine Doppelbestimmung des Analyten hinaus. Die Abnahme der über die immunogene Zone integrierten Signalintensität (konzentrationsproportional) muß bei einem Verdrängungsassay der betreffenden Zunahme in der "Molekülfänger"-Zone (s. Abb. 2) entsprechen. Analoges gilt auch für die Methode, bei der das markierte Analytmolekül vor jeder Analyse der Probe in einem bekannten Verhältnis beigemischt wird. Durch ein Auffangen der nichtgebundenen markierten und unmarkierten Analytmoleküle in einer speziellen Fängerzone läßt sich aus der dort meßbaren Konzentration an markierten Analytmolekülen direkt auf die Konzentration der unmarkierten Analytmoleküle, die in der Probe vorliegen, schließen. Je höher die Konzentration an markierten Analytmolekülen nach dem Durchströmen der immunogenen Zone, desto höher die Analytkonzentration in der Probe.

Ein weiterer Vorteil (empfindlicher und ungestörter als bisherige Verfahren auf nicht enzymatischer Basis) der Erfindung ist die Abtrennung der nicht spezifisch gebundenen Matrixsubstanzen vor der eigentlichen Messung sowie die Sammlung oder Anreicherung der markierten Moleküle auf einer flachen Oberfläche, auf der unmarkierte Partnermoleküle mit freien Bindungsstellen fest angebunden sind, so daß sie die markierten Partner, die den anderen immunologischen Bindungsbereich ungebinden durchlaufen haben oder dort durch den unmarkierten Analyten freigesetzt (aus der Bindung verdrängt) wurden, spezifisch anbinden. Die auf einer flachen Oberfläche angebundenen markierten Analytmoleküle, deren Menge nach Kalibration eine Information über die in der Probe vorliegenden (unmarkierten) Analytmoleküle erlaubt, können dann, je nach Art der Markierung, elektrochemisch oder optisch bestimmt werden, wobei sowohl lange Meßzeiten mit hoher Dämpfung als auch zyklische oder repetitive Messungen mit elektronischer (oder rechnergestützter) Mittelwertbildung möglich sind. Nach den Gesetzen der Statistik läßt sich durch N Messungen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um den Faktor Wurzel-N verbessern.

Anstelle der spezifisch bindenden Immuno-Partner-Moleküle mit freien Bindungsplätzen als selektive "Molekülfänger" nach der primären kompetitiven Immuno-Reaktion können auch andere Sammelphasen verwendet werden.

Bei lipophilen Analytmolekülen reicht dazu eine zu durchströmende Zone, die mit Öl oder Wachs (oder PVC plus Weichmacher o.ä.) getränkt ist, aus. Alternativ kann dafür auch ein Material verwendet werden, daß in der reversed phase Chromatographie üblich ist (z.B. RP-18 stationäre Phase). Das letztere bietet sich insbesondere an, wenn ionisch vorliegende Analytmoleküle festgehalten werden sollen. Hier gibt man der Fließlösung ein entsprechend geladenes, lipophiles Gegenion zu. Dadurch kommt es zu einer Ionenpaarbindung im Öl oder Fett, welche eine Erschwerung der Passage der markierten Analytmoleküle durch diese Molekülfängerzone bewirkt. Sie werden sich bei einer strömenden Trägerlösung gegen Ende der lipophilen Zone anreichern und können so der empfindlichen Messung zugänglich gemacht werden.

Eine besonders einfache und elegante Vorrichtung stellt in diesem Zusammenhang mit der Erfindung die Verwendung von teststreifenähnlichem chromatographischen Material dar. Hier kann sowohl die Papierchromatographie (erweitert um die Membranfiltermaterialien auf Celluloseacetat, -nitrat o.ä. Basis) als auch die Dünnschichtchromatographie Material-Lieferant (s. Abb. 2) sein. Die Produktion der erfindungsgemäßen Vorrichtungen geschieht denkbar einfach und rationell. Im Bereich der umweltanalytischen Anwendung des hier offenbarten Verfahrens werden die entsprechenden poly- oder monoklonalen Antikörper bzw. F_{ab} -Fragmente mit Hilfe bekannter Bindungstechniken (kovalente Immobilisierung mittels Spacermoleküle und F_c -Teil bindenden Komponenten) richtig orientiert (Bindungsstellen nach außen) auf über 75 % der Teststreifenfläche aufgebracht. Nach Fixierung dieser analyterkennenden Makromoleküle auf der Teststreifenoberfläche wird der Anfangsbereich in eine Lösung getaucht, die nur markierte Analytmoleküle enthält. Dadurch werden alle Bindungsstellen mit diesem markierten Analytmolekül abgesättigt. Die Länge dieser immunogenen Zone entspricht dabei der Größe des Meßbereichs. Danach wird gründlich gespült, um rein adsorptiv gebundene, markierte Analytmoleküle zu entfernen. Der Rest des Teststreifens enthält nunmehr die analyterkennenden Antikörpermoleküle (oder bei den anderen analogen Reaktionen, die entsprechenden DNA's oder Wirtsmoleküle) mit freien Bindungsstellen und dient als Molekülfänger für die spätere Messung. Zum Abschluß dieser

Sammelzone kann vorteilhafterweise eine dünne Zone mit Dialysier-Eigenschaften verwendet werden.

Dadurch wird erreicht, daß der fließende Grundelektrolyt (durch die Art der Antikörpermoleküle bestimmt) zwar diese Zone passieren kann, die größeren markierten Analytmoleküle aber zurückgehalten werden und dadurch in einer extrem kleinen Zone auch angereichert werden. Diese Anordnung kann auch in durchsichtigen Glasröhren oder preiswerteren Plastikröhren, gefüllt mit dem betreffenden chromatographischen Material, durchgeführt werden. Falls diese Röhre mit der Dialysiermembran abgeschlossen wird, kann man auch auf andere Sammelzonen verzichten. Hier muß nur der ungehinderte Zugang der optischen Strahlengänge garantiert werden, die hier vorzugsweise nicht seitlich der Röhre sondern axial angebracht werden. Bei redoxmarkierten Analytmolekülen wird diese Dialysierfolie demontierbar angebracht, so daß deren Innenseite mit den aufgesammelten, markierten Analytmolekülen, die in der primären Immunozone analytproportional freigesetzt worden sind, der planaren elektrochemischen Zelle zugänglich gemacht werden. Selbstverständlich kann letztere auch zuvor durch mikroelektronische Methoden fest auf die Innenseite der Dialysierfolie aufgebracht sein.

Die Elektrodenflächen sind miniaturisiert und erfordern nur minimale Edelmetallmengen, so daß auch in diesem Fall die Prüfröhrchen-ähnlichen Gebilde nach einer Messung verworfen werden können. Die Röhrenanordnung erfaßt wegen der größeren Menge an immobilisierten analyterkennenden und -bindenden Antikörpermolekülen einen größeren Konzentrationsbereich des Analyten, d.h. die Kalibrierkurve geht später als bei den planaren Anordnungen in einen Sättigungsbereich über. Die Auswertung kann auch über die verdrängten Strecken (oder integriert davon) erfolgen (s. Abb. 2). Dazu kann ein preiswerter Laserdioden Scanner verwendet werden.

Zur Anreicherung der freigesetzten oder nicht gebundenen markierten Analytmoleküle kann sowohl bei der Verdrängungsmethode als auch beim kompetitiven Verfahren (jeweiliger Zusatz von markierten Analytmolekülen zu Beginn des Assays) auch eine freie Endzone der oben erläuterten An-

ordnungen dienen, bei der aber das Lösungsmittel verdampft. Die ausgewählten, stabilen Redox-Marker-Moleküle sowie die IR-Fluoreszenzmoleküle vertragen dabei auch Temperaturerhöhungen. Bei Antikörperverträglichkeit lassen sich auch leichter verdampfbare Lösungsmittel zu Effizienzsteigerung verwenden, wobei auch eine Zudosierung nach der primären immunogenen Zone möglich wird. Wichtig ist, daß die Verdampfung zur Konzentrierung der Markermoleküle auf eine kleine Zone (Bereich) beschränkt wird. Weil dadurch das Lösungsmittel die zu detektierenden Moleküle dorthin transportiert bevor es verdampft und seine Transportfracht dort zurück läßt. Die Abb. 1 bis 2 verdeutlichen anhand von Skizzen die verschiedenen Anordnungsmöglichkeiten.

Die erfindungsgemäß optimierte elektrochemische Meßmethode stellt eine zyklische Voltammetrie in Verbindung mit einem stabilen Redoxsystem dar, wobei sich letzteres von allen möglichen dadurch auszeichnet, daß es eine besonders hohe Standardaustauschstromdichte besitzt. Die zyklische Voltammetrie garantiert bei Dünnschicht-Meßzellen, daß nettomäßig keine Meßsubstanz elektrochemisch umgesetzt, d.h. verbraucht wird. Hierbei wird stets nur oxidiert und reduziert. Die höchste Meßempfindlichkeit wird erfindungsgemäß dann erzielt, wenn der Potentialbereich, in dem die Arbeitselektrode(n) zyklisch betrieben wird, das Halbstufenpotential des Redoxmarkers einschließt ($\pm 200-600$ mV). Bei hohen Potentialänderungsgeschwindigkeiten ($\gg 500$ mV/sec Scanrate) entstehen bei Arbeitselektroden > 10 mm anodische und kathodische Stromspitzen, die der Konzentration des Redoxsystems proportional sind. Je höher die Scanrate desto größer werden die Stromspitzen, was einer Empfindlichkeitssteigerung gleichkommt. Werden als Redox-Marker, Systeme mit den höchsten Standardaustauschstromdichten (z.B. Ferrocenverbindungen, Rutheniumkomplexe, Hexacyanoferrat II/III, J^-/J u.a. verwendet, dann stören nicht vollständig abgetrennte Redoxsysteme aus der Probenmatrix wesentlich weniger, wenn mit kurzen Zykluszeiten (schneller Spannungsrampen) gearbeitet wird. Die besten, reversiblen Redoxsysteme lassen hierbei durchaus über 1000 zyklische Voltammogramme pro Sekunde (1000 Hz !) zu. Restbestände von weniger reversiblen, eventuell störenden Redoxsystemen aus der Probenmatrix lassen sich elektrochemisch nicht so schnell umsetzen und erzeugen daher auch kein Meßsignal (Stromfluß).

Alternativ können andere elektrochemische Methoden angewandt werden, die zu keinem Verbrauch oder Netto-Umsatz des reagierenden Systems führen, d.h. auch die Methode der Pulsvoltammetrie oder der differentiellen Pulsvoltammetrie oder der Square-wave Voltammetrie sind hierzu geeignet, lassen sich aber aus prinzipiellen Gründen nicht so schnell zyklisch betreiben.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Verfahrensschritt, der vorteilhafterweise zur gewünschten extremen Empfindlichkeitssteigerung führt, liegt in einer speziellen Kompensationsmethode für den bei schnellen Arbeitselektrodenpotential-Scanraten zunehmenden kapazitiven Strom, der den Signaluntergrund bildet.

Dazu wird ein computergesteuertes Auswertsystem verwendet, das mittels eines schnellen AD-Wandlers wie ein Scanrecorder arbeitet. Die Kompensation des nicht-faradayschen Untergrundstromes, die ebenfalls zur Empfindlichkeitsteigerung einen entscheidenden Anteil beiträgt, kann auf zwei Arten erfolgen, die für sich allein oder zusammen verwendet werden können. Bei Arbeitselektroden mit Durchmessern über 10 mm wird die Kanalzuordnung des Scanrecorders bei Erreichen des Potentialumkehrpunktes ebenfalls umgekehrt, als ob mit einem X-Y-Scheiber die Spannung an der Arbeitselektrode gegen den fließenden Strom (engl. C-V Diagram) aufgezeichnet würde. Da dies einer einfachen Signaladdition gleichkommt, kompensieren sich pro Meßkanal (Zeitfenster oder Potential) gleich große anodische und kathodische Ströme. Lediglich bei den um ca. 60 mV auseinanderliegenden Stromspitzen ist das nicht der Fall.

Ein weiterer Schritt, der für das Ziel dieser Erfindung wesentlich von Vorteil ist, ist die erst durch schnelle Wiederholmessungen ohne Verbrauch der gemessenen Substanz mögliche elektronische Mittelwertbildung. Mit einem Signalmittelwertbildner läßt sich zusätzlich dabei auch noch das Signal/Rauschverhältnis (S/R) drastisch steigern, weil man mehrere Tausend Zyklen mitteln kann. Da man bei reversiblen Redoxsystemen leicht weit über 100 Potentialzyklen pro Sekunde ($>>100$ Hz) durchscannen kann, ergibt sich hier beispielsweise schon in einer Sekunde eine Verbesserung

des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses um den Faktor 10. Bei Meßzeiten, die denen der Immuno-Assay-Verfahren mit Enzymmarkern entsprechen, ergeben sich Verbesserungen dieses die Nachweisgrenze bestimmenden S/R-Verhältnisses um mehrere Größenordnungen, ohne daß die Nachteile der empfindlichen Eiweißmoleküle (Enzyme) hier stören. Das zweite Verfahren zur Unterdrückung des störenden kapazitiven Stromuntergrundes bei der zyklischen Voltammetrie verwendet als Arbeitselektrode ein Ultramikroelektroden-Array mit Einzelelektroden durchmessern von unter 10 µm. Hier entstehen keine anodischen und kathodischen Stromspitzen mehr sondern eine Stromstufe mit gut ausgeprägten Plateaus. Die Stufenhöhe ist ähnlich wie bei der Polarographie der Konzentration des elektrochemisch umgesetzten Redoxsystems (Markermoleküls) proportional. Die erfindungsgemäße Vorrichtung verwendet hierzu eine planare Array-Anordnung von ca. 2000 Einzelelektroden mit 3 µm Durchmesser, bei der die Bezugs- und Gegenelektrode bereits optimiert in die Oberfläche integriert vorliegt. Hier hat sich nur eine von vielen möglichen geometrischen Anordnungen als geeignet erwiesen (siehe Abb. 3).

Die neue Anwendung der zyklischen Voltammetrie zur Erzielung extremer Meßempfindlichkeiten bei Redoxsystemen oder Markermolekülen mit Redoxgruppen ist dadurch möglich, weil durch die abwechselnde Oxydation und Reduktion kein Verbrauch des Meßstoffes auftritt. Eine Wegdiffusion des Redoxsystems wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine Dünnschichtzellen-Anordnung gewählt wird. Hierbei werden die Arbeitselektrode(n) sowie die Gegen- und Referenzelektrode gegen die mit Grundelektrolyt befeuchtete Oberfläche mit den redoxmarkierten Partnermolekülen gedrückt. Gegebenenfalls können die unmarkierten Partnermoleküle, die die redoxmarkierten Moleküle binden, auch direkt auf oder unmittelbar neben der Elektrodenoberfläche immobilisiert sein. Die Zyklisierung ist bei Nachweisgrenzen unter 1 ppb (Redox-System) notwendig, denn bei solch extrem kleinen Konzentrationen müssen möglichst alle Moleküle elektrochemisch erfaßt werden. Dann entspricht eine Stromstärke von einem nA einer umgesetzten Substanzmenge von ca. 10^{-10} mol/sec. Derzeitig erlauben gute elektrochemische Meßzellen auch noch zuverlässige Strommessungen im nA-Bereich, was einer tausendfach kleineren Umsatzrate entspricht. Durch

14

die Signalmittelwertbildung werden nunmehr Pico- und Femto-Amperströme meßbar, was zu Umsatzraten von 10^{-16} resp. 10^{-19} mol/sec führt.

Bei der optischen Detektion erhält man die gewünschte Empfindlichkeitssteigerung durch die Kombination von mehreren, mindestens zwei Verfahrensmaßnahmen. Als erste Maßnahme verwendet man Markermoleküle, die im IR stark absorbieren, und im noch fernerem Infrarot fluoreszieren, weil dadurch der störende Fluoreszenzuntergrund von einigen Eiweißmolekülen (z.B. bei biologischen Matrices) nicht auftritt und die preiswerten Laserdioden als Anregungsquelle hoher spektraler Leuchtdichte besonders vorteilhaft sind. Das emittierte Laserlicht erlaubt durch seine geringe Strahlkonvergenz besonders exakte Abgrenzungen des Meßfensters. Als weitere Maßnahme verwendet Fluoreszenzmarkermoleküle, deren Fluoreszenz besonders langsam abklingt, so daß man diese Fluoreszenz gut von der schnell abklingenden der störenden Moleküle in der Probenmatrix abtrennen kann. Im Gegensatz zu einer kommerziell erhältlichen Anordnung, bei der einfach das Anregungslicht durch einen Shutter unterbunden wird, und die eigentliche Messung des Fluoreszenzlichtes erst nach einigen Millisekunden (nach völligen Abklingen der Störfluoreszenzstrahlung) beginnt und über eine gewisse Zeit integriert wird, geschieht die Auswertung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren über eine direkt und schneller messende elektronische Berücksichtigung der langsameren Abklingzeit. Hierzu wird ein Lock-In Verstärker benutzt, der eine frequenz- und phasenselektive Verstärkung ermöglicht. Die Unterdrückung der störenden Fluoreszenz mit der schnellen Abklingzeit geschieht hier durch eine geeignete Wahl des Phasenwinkels am Meßgerät. Vorteil dieser Methode gegenüber der Zählratenmethode (Photonenzählung) der kommerziellen Version ist die höhere Empfindlichkeit, weil die frequenzselektive Verstärkung nur einen Bruchteil des meist weißen elektronischen Rauschens des Photo-Empfängers verstärkt und weil bei höheren Licht-Chopper Frequenzen gearbeitet werden kann, was die Anzeigegeschwindigkeit drastisch erhöht, so daß auch Durchflußmessungen, wie bei der FIA üblich, noch entsprechend sensitiv durchgeführt werden können.

Diese u.a. Vorteile werden bei der Erfindung erhalten durch::

- A) eine Art Affinitätschromatographischer Säule oder auch eine offene oder der optischen und elektrochemischen Messung zugänglichen Oberfläche eines beliebigen Trägermaterials mit immobilisierten Partnermolekülen zu dem zu bestimmenden Molekül (Analyt);
- B) eine gleichartige der Messung zugängliche "Sammeloberfläche" für freigesetzte markierte Analytmoleküle (im Falle einer Verdrängungsreaktion auf obiger Säule oder Oberfläche, die möglichst vollständig mit markierten immunogen gebundenen Analytmolekülen belegt ist, durch unmarkierte Analytmoleküle);
- C) eine erfindungsgemäße flache elektrochemische Meßzelle in einer aus zwei oder drei Elektroden bestehenden potentiostatischen Schaltung mit einer oder mehreren Arbeitselektroden, die eine Zyklovoltammetrie im elektroaktiven Bereich des betreffenden Redoxsystems (repetitive Oxidation und Reduktion) durchführt und die in unmittelbarem Kontakt mit der "Sammeloberfläche" oder der unter A) genannten gebracht werden kann;
- D) eine Fluoreszenzanordnung, die mittels Laserdioden zur Fluoreszenz bei Emissionswellenlängen > 700 nm anregt und die schnell zwischen einem unmarkierten Untergrund und den Stellen, wo die optisch markierten Analytmoleküle auf den betreffenden Oberflächen festgehalten werden hin und her oszilliert (alternativ können auch Fluoreszenzmarker verwendet werden, die die Methode der zeitverzögerten Fluoreszenz ermöglichen, wobei aber hier die direkte und schnelle Messung mittels eines elektronischen phasenselektiven Verstärkers erfolgt, die ebenfalls mit Hilfe von Lichtleitern schnell zwischen einem unmarkierten und markierten Untergrund hin und her oszillieren kann).
- E) einen elektronischen Signalmittelwertbildner oder eine computergestützte Aufaddition von Signal-Zeit-Kurven (Zeit proportional zur

Spannung bei der elektrochemischen Detektion oder zum Meßort beim optischen Verfahren). Dabei mittelt sich ein statistisches elektromechanisches Rauschen in den höchsten Empfindlichkeitsbereichen zu Null.

- F) Falls bei der auswertenden Messung sowohl die Änderung der markierten Analytmoleküle in der primären immunogenen Zone als auch die in der Sammelzone erfaßt wird, kann man neben einer Doppelmessung auch durch Quotientenbildung eine Art innere Standardisierung durchführen. Dies verbessert die Zuverlässigkeit der Messungen ähnlich wie bei der internen Standardisierung von emissionsspektroskopischen Methoden.

Die Oberfläche mit dem immobilisierten immunologischen Partnermolekül zum Analyten sollte im Interesse eines großen Meßbereichs hoch beladen sein. Auch muß das betreffende Molekül mit einer richtigen Orientierung (Epitop-Bereich außen) dort immobilisiert sein. Dies läßt sich u.a. auch unter Zuhilfenahme eines geeignet gewählten elektrischen Feldes (oder Stromes) an der Phasengrenze Trägeroberfläche/Meßlösung bewerkstelligen. Dadurch kommt es zu einer gerichteten Immobilisierung dieser Partner, ohne daß teure Spezialsubstanzen (als übliche Spacermoleküle) dafür benötigt werden. Die gerichtete Immobilisierung ergibt zusammen mit einer hohen Immobilisierungsdichte eine hohe Meßempfindlichkeit und einen großen Meßbereich. Alternativ können die immobilisierten Partnermoleküle aber auch durch die bekannten Techniken mittels F_c -Teil bindender Spacermoleküle (bei der im Umweltanalytikbereich üblichen Immobilisierung von Antikörpern) an Trägeroberflächen (z.B. Glas-Beads, chromatographische stationäre Phasen, Mikrotiterplatten etc.) angebunden werden.

Als besondere Variante der Ausführungsbeispiele bietet sich auch Papier als preiswerter Träger an. Hier kann sowohl laborübliches Filterpapier als auch Membranfilter auf der Basis von Cellulose oder anderer Materialien dienen. Auch chromatographische Dünnschicht Träger sind hierfür hervorragend geeignet, da sie oberflächlich leicht zu modifizieren sind. Eine bevorzugte Art sind in diesem Zusammenhang Dünnschichtplatten mit oder ohne Fluoreszenzgrundmarkierung, die schon in ein sog. Reversed

Phase (RP-Material) modifiziert wurden. Hier gelingt die gerichtete Immobilisierung der Partner Molekülsorte (d.h. des jeweils nicht den Analyt darstellenden Partners dieser sich gegenseitig bindenden komplementären Moleküle) dann besonders gut, wenn man diesen Molekülen gezielt gegenüber dem Epitopbereich eine oder mehrere langkettige aliphatische Reste (C_6-C_{25}) ansynthetisiert oder bei Antikörpern die gentechnisch erzeugten F_{ab} -Fragmente mit den spezifischen Bindungsstellen lipophile Molekülgruppen an der gegenüberliegenden Molekülstelle erzeugen läßt. Die lipophilen Reste der zu immobilisierenden Moleküle tauchen dann in die aliphatische Molekülbürste der Trägersoberfläche ein und werden so bei höchster Dichte ohne Beeinträchtigung des Bindungsverhaltens fixiert. Sie können aber bei Denaturierung oder Desaktivierung wie in der Chromatographie üblich eluiert werden, so daß der Träger für eine Immobilisierung mit frischen Molekülen zur Verfügung steht. Bei Verwendung von Dünnschichtplatten auf Basis einer Aluminiumfolie läßt sich letztere auch elegant bei der elektrochemischen Detektionsmethode als Gegenelektrode verwenden.

Dieser Prozeß kann auch dynamisch im Rahmen einer Fließinjektionsanalyse automatisiert werden, d.h. auf die unbeladene RP-Oberfläche werden zunächst die zu immobilisierenden Moleküle (ohne gebundenes Analytmolekül mit Marker aber auch mit) gegeben bevor nach einer Spülung zum Entfernen des Überschusses im Fall der unbeladenen Moleküle die markierten Analytmoleküle bis zur Absättigung über die Oberfläche geleitet werden. Nach einer erneuten Spülung kann dann die Probe aufgegeben werden. Die Verwendung von zugänglichen flachen Oberflächen für die Immobilisierung der Partnermoleküle kann einen Verfahrensschritt ersparen, denn man kann die Menge der dort gebundenen markierten Analytmoleküle bei beiden Versionen (Vorimmobilisierung mit markierten Analytmolekülen und Konkurrenzbindung von der mit der Probe zugesetzten markierten Analytmolekülen) sowohl mit der planaren elektrochemischen Meßzelle (durch einfaches Aufpressen auf die Oberfläche) als auch mit der optischen Fluoreszenzmethode leicht bestimmen ohne eine zusätzliche Sammeloberfläche zu benutzen.

Bei beiden Detektionsmethoden ist es wichtig, daß störende Stoffe aus der Probenmatrix vor den eigentlichen Messungen fortgespült werden. Dies erfolgt durch reine, gepufferte Elektrolytlösung, die sowohl die Stabilität der Biomoleküle unterstützt als auch den Grundelektrolyt für die elektrochemische oder optische Detektionsart darstellt.

Als Redox-Systeme werden bei der Erfindung diejenigen ausgewählt, die an dem verwendeten Arbeitselektrodenmaterial (Platin, Gold, anderes Edelmetall) die höchsten Standardaustauschstromdichten zeigen. Hierzu zählen von allen möglichen Redoxsystemen vorzugsweise nur die besonders reversiblen Systeme, wie die auf der Basis von Ferrocen, Rutheniumkomplexen, Hexacyanoferrat (II/III), Jod/Jodid etc. Besonders vorteilhafte Redoxsysteme haben ein Redoxpotential in der Nähe desjenigen von Sauerstoff, so daß sie von letzterem nicht gestört werden und man in diesem Fall die zyklische Voltammetrie auch ohne Inertgasspülung durchführen kann.

Bei der elektrochemischen Zelle läßt sich besonders vorteilhaft auch eine planare Mikroelektroden-Array-Anordnung einsetzen, weil bei Einzelelektroden durchmessern $< 10 \text{ mm}$ die Vorteile von Ultramikroelektroden auftreten. Letztere sind: Redox-Stufen statt Peaks im Voltammogramm, Verminderung des Verhältnisses von kapazitiven zu faradayschen Strom, Rührunabhängigkeit, quasi-verbrauchslose Messung schon ohne die Spannung zu zyklisieren u.a..

Als besonders vorteilhafte Molekülklasse für die Fluoreszenzmarkierung bieten sich z.B. an Bis-isothiocyanat-Derivat von 2-[4'-chloro-7'(3''-ethyl-2''-benzothiazolinylyden)-3',5'-(1'''-propanediyl)-1',3',5'-heptatrien-1'-yl]-3-ethylbenzothiazoliumbromid große Porphyrinringe oder geeignete Phthalocyanine an (siehe Abb. 4). Sie lassen sich durch die preiswerten langwelligen monochromatischen und fremdlichtfreien Laserlichtquellen anregen und erzeugen eine Fluoreszenz in einem Wellenlängenbereich, wo kaum andere Moleküle stören. Die Verwendung von Laserdioden mit entsprechenden IR-empfindlichen Halbleiterdetektoren erlaubt besonders kleine Meßaufbauten (z.B. Handmeßgeräte).

Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen und Arbeitsweisen werden anhand von Beispielen noch näher erläutert:

Beispiel 1

Verdrängung des markierten Analytmoleküls vom immunologisch präparierten Oberflächenbereich durch das unmarkierte Analytmolekül in der Probe:

Eine vorteilhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anordnung und des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht auf einer kompetitiven Reaktion zwischen markiertem und unmarkiertem Analytmolekül. Hier kompensieren sich nichtspezifische Anbindungen, da sie in beiden Fällen im gleichen Ausmaß auftreten. Wünschenswert ist ferner, daß das unmarkierte Analytmolekül eine etwas geringere Bindungskonstante als das markierte aufweist, um es effektiver verdrängen zu können. Dies ist in der Regel der Fall, da die kovalente Verknüpfung mit einem relativ großen Markermolekül die Antikörper-Antigen-(bzw. allgemein: Molekül-Komplementärmolekül-) Bindung schwächt, weil sich beide Moleküle nicht mehr optimal nähern können.

Als Modellanalyt wurde in diesem Beispiel Humanserumalbumin (HSA) gewählt. Als immobilisiertes Partnermolekül wurde der dazugehörige Antikörper (anti-HSA) verwendet. Die anti-HSA Antikörper wurden mit den bekannten Immobilisierungstechniken an die Oberfläche von Sepharose-Material kleiner Korngröße (150 nm) angebunden und mit fluoreszenzmarkierten HSA belegt. Als Fluoreszenzmolekül wurde eine Europiumchelate (BCPDA) gewählt. An ein HSA Makromolekül konnten mehrere fluoreszierende Chelatkomplexe kovalent angebunden werden (20-30). Die Europiumchelateverbindung wurde in diesem Beispiel anstelle des IR-Licht emittierenden Markers genommen, weil die hier auftretende Fluoreszenz wesentlich langsamer abklingt als die der störenden Probenmatrix (Eiweißmoleküle bei biologischen Proben). Gemessen wurde am Ende einer kleinen Säule, die mit den Sepharose-Material und dem markierten Immunkomplex beladen war. Bei Zugabe von unmarkierten HSA wurde das mit dem Fluoreszenzmarker versehe-

ne von der Oberfläche der mit HSA-Antikörpern beladenen Sepharose-Partikel verdrängte HSA Molekül in einer Durchflußmeßzelle vermessen. Dazu wurde Licht der Wellenlänge 350 nm verwendet, dessen Strahlengang durch einen optischen Chopper mit einer Frequenz von 140 Hz zerhackt wurde. Im rechten Winkel zum Anregungslicht wurde das Fluoreszenzlicht gemessen. Als Lichtdetektor wurde ein Photomultiplier verwendet und am Lock-In Verstärker ein Phasenwinkel von 0° eingestellt. Die Abb. 5 zeigt die Signale, die durch die Zugabe von unmarkiertem HSA gemessen werden können. Sie sind der HSA-Konzentration der auf die Säule aufgegebenen Probe proportional. Durch diese Meßtechnik lassen sich pro Zeiteinheit wesentlich mehr Proben analysieren, als mit der Photonenzählung, die auch der FIA-Technik verschlossen bleibt. Neben HSA konnten durch die Immobilisierung entsprechender mono- und polyklonaler Antikörper auch andere Analyte, wie Atrazin oder andere Schadstoffe sehr empfindlich im sub ppm-Bereich mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

Beispiel 2

Elektrochemische Detektion von Redox-markierten Analytmolekülen:

Als Analyt wurde das umweltrelevante Atrazin gewählt. Letzteres wurde durch Standardmethoden der organischen Synthese in 6 Stufen mit einem modifizierten Ferrocen-Molekül kovalent verknüpft. Das ausgewählte, sehr reversible Redox-System mußte zuvor in eine wasserlösliche Form durch Anfügen stark polarer Seitenketten überführt werden. Die einzelnen chemischen Syntheseschritte, die - ausgehend vom kommerziell erhältlichen Ausgangsprodukt - notwendig waren sind in Abb. 6 aufgeführt.

Die letzte Verbindung, das redoxmarkierte Atrazin wurde nach Reinigung sowohl für die Verdrängungsmethode als auch für die kompetitive Methode in einem Atrazin-Assay eingesetzt. Die entsprechenden Antikörper wurden von Hock et al. in der Literatur beschrieben [1,2]. Die Abb. 7 zeigt zyklische Voltammogramme dieses redoxmarkierten Atrazins in extrem hoher Verdünnung auf einer Trägeroberfläche. Bedingt durch den unmittelbaren

Kontakt des Redoxsystems mit der Arbeitelektrodenoberfläche und dem Nichtvorhandensein von andiffundierenden oder abdiffundierenden Redoxmolekülen ergeben sich im zyklischen Voltammogramm scharfere Peaks als üblich. Dieser Effekt wirkt auch empfindlichkeitssteigernd.

Beispiel 3

Steigerung der Nachweisgrenze durch repetitive elektrochemische Oxidation mit anschließender Reduktion:

Als reversibles Redox-System wurde Hexacyanoferrat (II/III) in einem Verhältnis von etwa 1 : 1 gewählt. Die typische Nachweisgrenze für dieses System bei der klassischen zyklischen Voltametrie liegt im millimolaren Konzentrationsbereich. Durch die Methode der elektronischen Signalmittelwertbildung, die hier wegen der verbrauchslosen Meßtechnik angewandt werden kann, lassen sich, wie Abb. 8 zeigt, noch extrem geringe Redoxkonzentrationen weit unterhalb des mikromolaren (mmol/L) Bereiches mit einem sehr guten Signal/Rauschverhältnis quantitativ bestimmen. Bei einer Zyklusfrequenz von ca. 1000 Hz können beispielsweise in einer Sekunde 1000 Oxidations- und Reduktionsreaktionen durchgeführt werden, was bezüglich des elektrochemischen Signals gleichbedeutend mit einer zehntausendfach höheren Redoxmittelkonzentration (verglichen zur üblichen 0,1 Hz Arbeitsweise) ist oder einer entsprechend erhöhten Elektronentransferzahl entspricht, was gleichbedeutend wäre mit einem Analytmolekül, an dem eine entsprechende Anzahl von Ein-Elektronen-Redoxmolekülen angebunden wären.

Beispiel 4

Unterdrückung des kapazitiven Stromanteils bei schnellen zyklischen Voltammogrammen durch Anwendung der zyklischen Mittelwertbildung:

Bekanntlich tritt bei schnellen Potentialänderungsgeschwindigkeiten wegen der entsprechenden Umladung der Doppelschichtkapazität an der Arbeitselektroden-Grenzfläche ein sog. kapazitiver Strom auf, dessen Größe leider proportional zur Änderungsgeschwindigkeit ist, so daß eigentlich eine extrem schnelle Zyklusgeschwindigkeit bei der zyklischen Voltammetrie ausgeschlossen sein sollte, weil dieser Anteil den des betreffenden Redox-Peaks (faradayscher Strom) bei weitem übersteigt und zu Voltammogrammen führt, wie sie in Abb. 9 dargestellt werden. Führt man hingegen bei Makro-Arbeitselektroden die Spannungskoordinatenwerte ähnlich wie bei einem X-Y-Schreiber rückwärts zählend auf die einzelnen Digitalkanäle des Mittelwertbildners oder Scan-Recorders mit dieser Vorrichtung, so führt die Umkehrung des Vorzeichens der Stromstärke bei der Aufaddition in ein und denselben Kanal (der einem genau bestimmten Arbeitselektrodenpotential zugeordnet ist) zu einer Kompensation des kapazitiven Stromanteils. Dies geschieht nahezu vollständig, da der Kapazitätsstrom bei konstanter Doppelschichtkapazität (bei gleichem Arbeitselektrodenpotential) bis auf das Vorzeichen der Potentialänderungsgeschwindigkeit dU/dt proportional ist. Lediglich die faradayschen Strompeaks, die proportional der Konzentration des Redoxsystems sind, werden durch diesen Schaltungstrick nicht kompensiert, da sie bei unterschiedlichen Potentialen ablaufen. Man erhält also ein rauscharmes, gemitteltes zyklisches Voltammogramm, daß wie in Abb. 8e gezeigt, aussieht. Erst durch diese schaltungstechnische und elektronische Vorrichtung ist es möglich, mit Potentialzyklusraten von weit über 100 Hz zu arbeiten.

Beispiel 5

Unterdrückung des kapazitiven Stromanteils durch Anwendung eines Ultra-Mikroelektroden-Arrays:

Wird die Oberfläche der Arbeitselektrode verkleinert, so verringert sich die zugehörige Doppelschichtkapazität wesentlich stärker als die faradaysche Stromdichte, d.h. das Verhältnis von faradayschem Strom (der analytproportional ist) zu kapazitivem wird extrem verbessert, so daß

extrem schnelle Potentialänderungsgeschwindigkeiten vom > 500 V/sec möglich werden. Zusätzlich sorgen die veränderten Diffusionsbedingungen für die elektroaktive Species zu einer anderen Signalform. Ultra-Mikroelektroden (Durchmesser < 10 nm) erlauben zum Unterschied zu einer planaren Diffusion bei Makroelektroden sphärische Diffusionsbedingungen und setzen so wenig Substanz um, daß es zu keiner in die Lösung hineinwachsenden Verarmungsschicht kommt, was sich im Voltammogramm durch eine klare Stufe und ein stabiles Grenzstromplateau zeigt. Die Abb. 10 zeigt den Unterschied zwischen einem zyklischen Voltammogramm einer Spur eines Redoxsystems bei einer Makroelektrode und einem Ultra-Mikroelektroden-Array der in Abb. 3 offenbarten geometrischen Anordnung. Das Array hat genau die gleichen Eigenschaften wie eine einzelne Ultra-Mikroelektrode, hat jedoch den Vorzug, daß die Stromstärke entsprechend der Anzahl der Elektroden vergrößert ist.

Beispiel 6

Anordnung für eine besonders einfache Ausführungsform:

Anstelle der erzwungenen Strömung bei der Fließinjektionsanalyse können vorzugsweise auch Kapillarkräfte herangezogen werden. Neben dem Prinzip der Papier- und Dünnschichtchromatographie können auch andere Träger für die immobilisierten Partnermoleküle verwendet werden. Ein Beispiel dafür kann ein Stück einer säulenförmigen Kreide (oder Sinterglas/keramik) darstellen. Hier werden bei haptenähnlichen Analyten die Antikörpermoleküle schon vor der Immobilisierung an der Kreideoberfläche mit den markierten Analytmolekülen abgesättigt. Die Immobilisierung kann durch einfaches Eintauchen in dieser Lösung geschehen, wobei man die Laufstrecke beobachten kann. Die Molekül-Assoziate werden mittels bifunktionaler Reagenzien quervernetzt bzw. an der Oberfläche fixiert. Von dieser primären immunologischen Zone wird, getrennt durch eine unbehandelte Fließstrecke, eine zweite Molekül-Sammelzone errichtet. Aus Gründen einer hohen Empfindlichkeit genügt hierbei ein schmaler Bereich unmittelbar am Ende des Kreideträgers. Im Beispiel wird die Endoberfläche mit den glei-

chen Antikörpern versehen, die auch in der primären immunologischen Zone verwendet wurden, nur mit dem Unterschied, daß hier die analytselektiven Bindungsstellen frei sind, so daß sie die durch den unmarkierten Analyten in der Probe freigesetzten markierten Analytmoleküle wieder auf sammeln und auf kleinstem Raum konzentrieren. Die elektrochemische oder fluorimetrische Messung erfolgt dann auf der polierten Endfläche der Kreidesäule. Die Strömung eines Trägerelektrolyten oder der Probe durch die Kapillarkräfte wird durch Aufsetzen eines saugfähigen Pfropfens auf diese Endfläche aufrechterhalten. Die vermessene Probemenge muß aus der Abnahme des Probenvolumens ermittelt werden.

Wird bei der Erfindung ein Träger (z.B. Durchfluß-Säule, Fließpapier, Membranfilter etc.) verwendet, an dem ein Partner gebunden ist, wird dieser mittels einer kompetitiven Reaktion durch den unmarkierten Analyten verdrängt. Er wird jedoch am Ausgang der Säule noch vor der Messung erneut von immobilisierten Komplementmolekülen gebunden und dadurch zur eigentlichen Messung angereichert wobei gleichzeitig auch störende Begleitstoffe durch Spülen entfernt werden können bevor die extrem empfindliche elektrochemische oder optische Messung repetitiv durchgeführt wird und durch Signalmittelwertbildung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis beliebig gesteigert wird.

Verfahren und Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung besonders empfindlicher Immuno-Assays und weiteren Assays, die auf Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär- DNA-Strang- sowie Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungskräften beruhen, gekennzeichnet durch schnelle und repetitive Messungen der Stromstärke oder des Fluoreszenzlichtes und Doppelmessung und Vergleich/Quotientenbildung in mindestens zwei Meßzonen bzw. Kalibrierung analog der Methode des inneren Standards, unter Verwendung stabiler redox- oder IR-fluoreszenzmarkierter Analytmoleküle bei Immuno-Assays und ähnlichen Assays.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als analyterkennende Moleküle oder Molekülassoziationen die jeweiligen Partner der sich extrem selektiv verbindenden Molekül-Paare: Antikörper (Antikörperfragment mit Bindungsstelle) - Antigen, Molekül - Rezeptor, DNA-Abschnitt - komplementärer DNA-Abschnitt sowie Gastmolekül - Wirtsmolekül an besonderen Oberflächen und in bestimmten Zonen verteilt immobilisiert verwendet werden.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zum Analyten komplementäre Partnermolekül an einem stationären Träger an zwei getrennten Zonen immobilisiert wird, wobei die Moleküle der ersten Zone zu Beginn einer Analyse mit dem redox- oder fluoreszenzmarkierten Analytmolekül abgesättigt werden, so daß dadurch alle Bindungsstellen blockiert sind und bei Kontakt mit dem nicht markierten Analytmolekül aus der Probe eine Verdrängung der markierten Analytmoleküle stattfindet, wobei letztere aber an anderer Stelle der Vorrichtung auf möglichst kleinem Volumen wieder gesammelt werden, bevor sie elektrochemisch oder optisch repetitiv bis zum gewünschten Signal/Rauschverhältnis vermessen werden.

4. Vorrichtung nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß neben der Verdrängungsreaktion auch eine kompetitive Bindungsreaktion zwischen dem unmarkierten Analytmolekül in einer Probe und dem redox- oder fluoreszenzmarkierten Analytmolekül, das jeder Probe im bekannten Verhältnis zugegeben werden muß, an trägergebundene Partnermoleküle ablaufen kann, wobei hier nach Spülung der nicht gebundenen Moleküle und Entfernen der Probenmatrix die repetitive elektrochemische oder optische Messung erfolgen kann.

5. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die betreffenden analyterkennenden Komplementmoleküle auf Trägeroberflächen immobilisiert sind, die die repetitive elektrochemische oder optische Messung ermöglichen, also entweder den innigen Kontakt mit einer planaren elektrochemischen Drei-Elektroden-Meßzelle erlauben bzw. die Messung des IR-Fluoreszenzlichtes ermöglichen.

6. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger für die an bestimmten Stellen fixierten analyterkennenden und selektiv bindenden Komplementmoleküle neben dem typischen Mikrotitermaterial Polystyrol vorzugsweise chromatographische stationäre Phasen, wie adsorbentiengefüllte Säulen, RP-18 ähnliche Materialien, Fließpapierstreifen, Membranfilterstreifen auf Cellulosebasis o.ä., die Kapillarflußeigenschaften haben, verwendet werden.

7. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer Probenlaufstrecke (Art affinitätschromatographischer Miniatursäule) mindestens eine primäre immunologische (oder allgemein: analyt-spezifisch bindende) Zone gegebenenfalls zusammen mit einer weiteren Sammel- und Anreicherungszone vorhanden ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die affinitätschromatographische Abtrennung, Verdrängung oder kompetitive Anbindung entweder planar durchgeführt wird, so daß die planare elektrochemische Drei-Elektroden-Meßkette ungehinderten Kontakt mit unterschiedlichen Oberflächenabschnitten finden kann und auch die optische Messung alternativ zwischen einem Trägeruntergrund und den Meßzonen oszillieren kann.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Sammel- und Anreicherungsphase eng begrenzte Zonen in der Proben-Fließrichtung hinter der primären immunogenen Zone (obiger Definition) angelegt werden, die aus den betreffenden analyterkennenden und -bindenden Komplementmolekülen bestehen, die aber freie Bindungsstellen haben und die so gesammelten redox-aktiven oder fluoreszierenden Analytmoleküle der repetitiven Messung zuführen.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als zweite Sammel- und Anreicherungszone die Lipophilie der markierten Analytmoleküle dadurch ausgenutzt wird, daß anstelle der betreffenden Komplementmoleküle eine lipophile Zone mit öl- oder wachsgetränkter Oberfläche oder RP-18 Material verwendet wird, wobei bei ionalen Analyten dieser Phase noch ein lipophiles Gegenion zur Ionenpaarbildung zugefügt wird.

11. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sammel- und Anreicherungsphase für die in der primären Reaktionszone verdrängten markierten Analytmoleküle durch eine entsprechend der Molmasse des markierten Analytmoleküls gewählten Dialysemembran gegeben ist, die in einem gewissen Abstand zur primären Reaktionszone angebracht ist, und die sowohl stationär mittels aufgedapfter Elektroden wie auch demontiert elektrochemisch vermessen werden kann.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß diese Dialysiermembran zusätzlich an der in Fließrichtung an erster Stelle liegenden Oberfläche die analytbindenden Komplementärmoleküle immobilisiert enthält.

13. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sammel- und Anreicherungszone dadurch erzielt wird, daß das Lösungsmittel durch Anwendung von Hitze und Transportgas am Ende der Probenlaufstrecke verdampft wird.

14. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die primäre analyterkennende und -bindende Reaktionszone und die davon getrennte Sammel- und Anreicherungszone innerhalb eines teststreifenähnlichen Trägers mit Kapillarkräften liegt, so daß der Transport der flüssigen Probe durch die verschiedenen Zonen durch letztere erreicht werden kann und keine externe Pumpe notwendig ist, wobei die Auswertung über konzentrationsproportionale Strecken oder integrale Signale über die charakteristischen Streckenabschnitte erfolgt und auch redundant ist. Das Auswertgerät ist hier ein Scanner mit optischer oder elektrischer Messung. Bei dem elektrochemischen "Scannen" werden walzenförmige Arbeitselektroden verwandt.

15. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung der Konzentration der redoxmarkierten Analytmoleküle auf den entsprechenden Oberflächenzonen der erfindungsgemäßen Vorrichtung durch die elektrochemische Methode der schnellen zyklischen Voltammetrie oder einer anderen Methode, die ohne Netto-Umsatz (Substanzverbrauch) arbeitet, mittels einer planaren Drei-Elektrodenmeßzelle, die zusammen mit einem geeigneten Grundelektrolyten auf diese Stellen gepresst wird, erfolgt (Prinzip der Dünnschicht-Meßzelle).

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die planare oder quasi-planare elektrochemische Drei-Elektrodenmeßzelle anstelle einer Makro-Arbeitselektrode aus einem Edelmetall, wie Platin, Gold o.ä. ein Ultra-Mikroelektroden-Array aus den gleichen Materialien mit Einzelelektroden durchmessern $< 10 \text{ mm}$ enthält, um den bei schnellen zyklischen Voltammogrammen stark ansteigenden kapazitiven Strom zu verkleinern.

17. Vorrichtung nach Anspruch 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Arbeitselektrode oder das dazu benutzte Ultra-Mikroelektroden-Array in die betreffenden Zonen des Assays integriert sind.

18. Vorrichtung nach Anspruch 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das zyklische Voltammogramm mit einer hohen Repetitionsrate im Be-

reich 1 bis $\gg 100$ Hz nicht wie üblicherweise auf einem X-Y-Schreiber sondern auf einem elektronischen Mittelwertbildner registriert wird, der so geschaltet ist, daß die digitalisierten Stromsignale in beiden Potentialrichtungen auf ein und denselben spannungsproportionalen Kanal addiert werden, was wegen des unterschiedlichen Vorzeichens des kapazitiven Stromanteils bei den unterschiedlichen Änderungsrichtungen einer nahezu 100 %igen Kompensation dieses störenden nicht-faradayschen Stromes gleichkommt, während die konzentrationsabhängigen Stromspitzen der Redoxmoleküle bei unterschiedlichen Potentialen auftreten und daher sich gegenseitig nicht kompensieren.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Arbeitselektrode das Ultra-Mikroelektroden-Array verwendet wird.

20. Vorrichtung nach Anspruch 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßvorgang eines Analyten automatisch computergesteuert in der Weise abfolgt, daß sowohl die von der Anordnung aufgenommene Probemenge als auch die Sammelzeit reproduzierbar eingehalten werden und die repetitive elektrochemische Messung jeweils mit gleicher Zahl an Additionszyklen, die von dem Signal/Rauschverhältnis abhängt, durchgeführt wird.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß als Redox-Marker-Moleküle, die mit dem Analytmolekül kovalent verknüpft werden, Redox-Systeme mit besonders hoher Standardaustauschstromdichte verwendet werden, die sich im betreffenden Lösungsmittel oder in der Probenmatrix lösen.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß als besonders reversible Redox-Systeme wasserlösliche, stabile und lagerfähige Ferrocenderivate, Rutheniumkomplexe, Hydrochinone, Hexacyanoferrat (II/III), Jod/Jodid o.ä. verwendet werden, die über Spacermoleküle mit dem Analytmolekül verbunden werden.

23. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 14 dadurch gekennzeichnet, daß als Markermoleküle für die repetitive optische Detektion stabile, lager-

SUBSTITUTE SHEET

fähige spezielle Moleküle verwendet werden, die Licht der Wellenlänge > 700 nm absorbieren und im langwelligeren Bereich wieder als Fluoreszenzlicht emittieren.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß als Molekülklasse für die vorteilhafte IR-Fluoreszenzmarkierung das Bis-isothiocyanat-Derivat von 2-[4'-chloro-7'(3''-ethyl-2''-benzothiazoliny-liden)-3',5'-(1'''-propanedyl)-1', 3', 5'-heptatrien-1'yl]-3-ethylbenzothiazoliumbromid, Porphyrinderivate mit großen $2n+1$ Pi-Elektronensystemen oder Phthalocyanine verwendet werden, die sich auch durch besonders hohe Extinktionskoeffizienten auszeichnen.

25. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die repetitive optische Messung, die dem Mittelwertbildner zugeführt wird dadurch erreicht wird, daß abwechselnd die zu messende fluoreszierende Oberflächenzone und der Trägeruntergrund an einer nicht mit der Sammelphase oder den Komplementärmolekülen bedeckten Stelle gemessen wird, was durch eine Relativbewegung des optischen Strahles erreicht werden kann.

26. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß als optische Anregungsquelle anstelle einer weißen Lichtquelle und eines Monochromators eine intermittierend betriebene Laserdiode im IR-Wellenlängenbereich mit hoher Strahlungsdichte, Monochromasie und Streulichtfreiheit zusammen mit einer Lock-in Verstärkungstechnik verwendet wird.

27. Verfahren zur Konzentrationsbestimmung eines Partners eines sich chemisch selektiv erkennenden komplementären Molekülpaars (Antikörper-Antigen, Rezeptor-Rezeptormolekül, DNA-Sequenz-komplementärer DNA-Strang, Gast-Wirtsmolekül) mittels eines Immuno-Assays nach den Ansprüchen 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß redox- und fluoreszenzmarkierte Analytmoleküle eingesetzt werden und die elektrochemische bzw. optische Messung der Verteilung dieser markierten Moleküle in den verschiedenen Zonen der Testvorrichtung ohne Materialverbrauch erfolgt, so daß beliebig viele repetitive Messungen möglich sind.

SUBSTITUTE SHEET

28. Verfahren nach Anspruch 1 und 27, dadurch gekennzeichnet, daß die repetitiven Messungen in reproduzierbarer Art und Weise einem Signalmittelwertsbildner zugefügt werden, so daß das Signal/Rauschverhältnis zwischen dem faradayschen Strom und dem Untergrund sowie der Oberfläche mit den fluoreszierenden Molekülen und der freien Trägeroberfläche entscheidend verbessert wird.

Verfahren und Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays

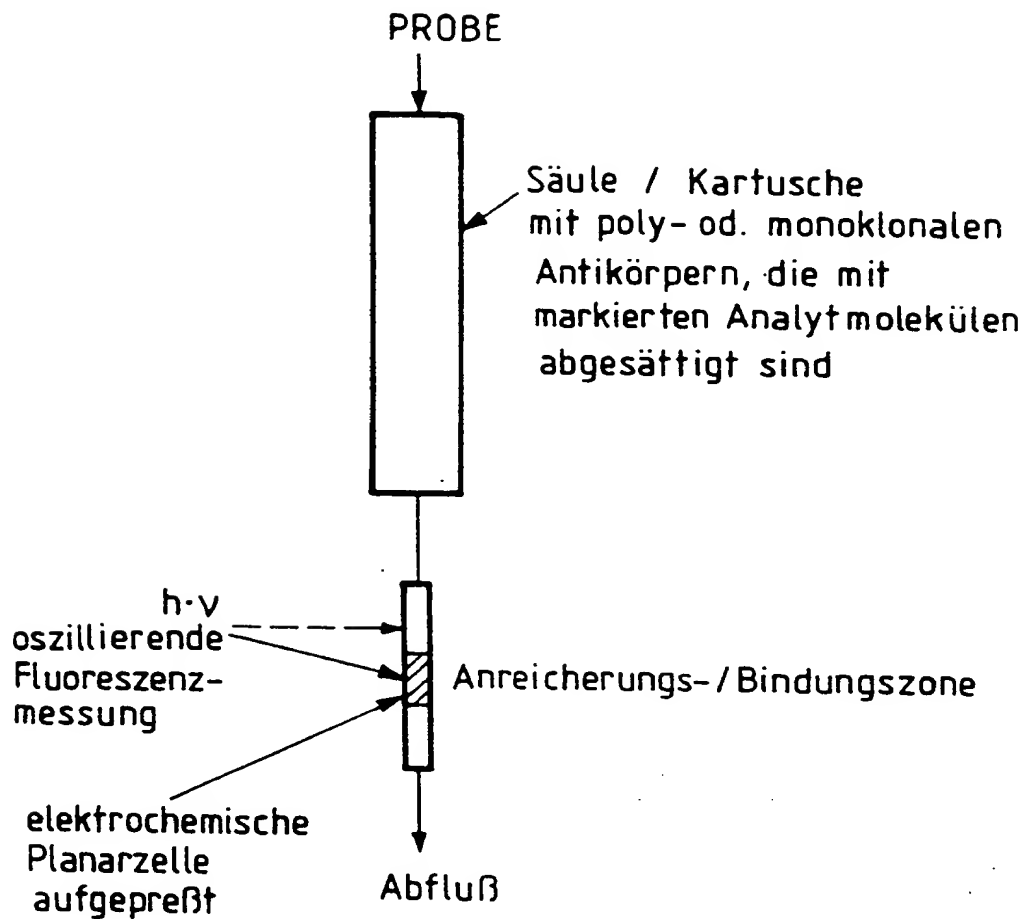
Zusammenfassung:

Verfahren zur Durchführung besonders empfindlicher Immuno-Assays und weiteren Assays, die auf Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär- DNA-Strang- sowie Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungskräften beruhen, mit schnellen und repetitiven Messungen der Stromstärke oder des Fluoreszenzlichtes und Doppelmessung und Vergleich/Quotientenbildung in mindestens zwei Meßzonen bzw. Kalibrierung analog der Methode des inneren Standards, unter Verwendung stabiler redox- oder IR-fluoreszenzmarkierter Analytmoleküle bei Immuno-Assays und ähnlichen Assays.

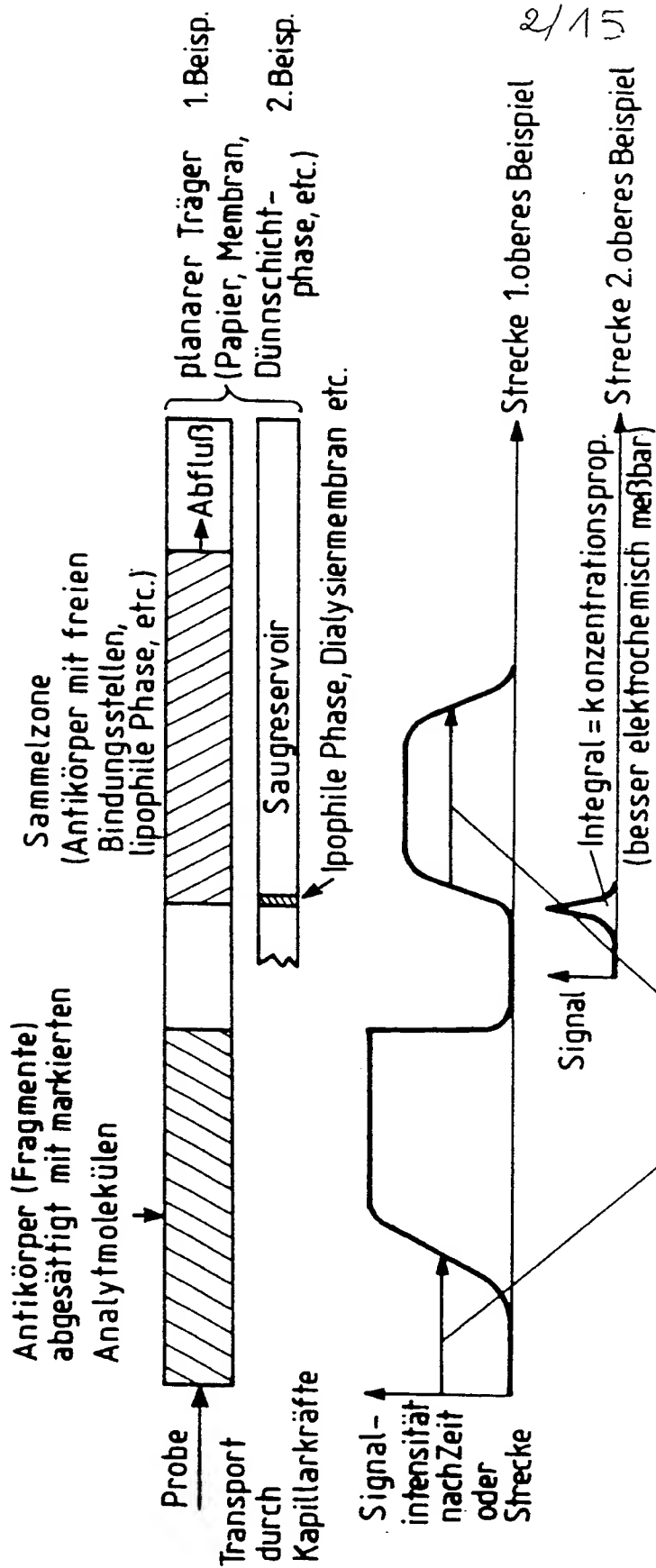
Fig. 1

1/15

Abb. 1



ERSATZBLATT



Strecke oder Integralwert des Signals = Konzentrationsproportional

Abb. 2

3/15

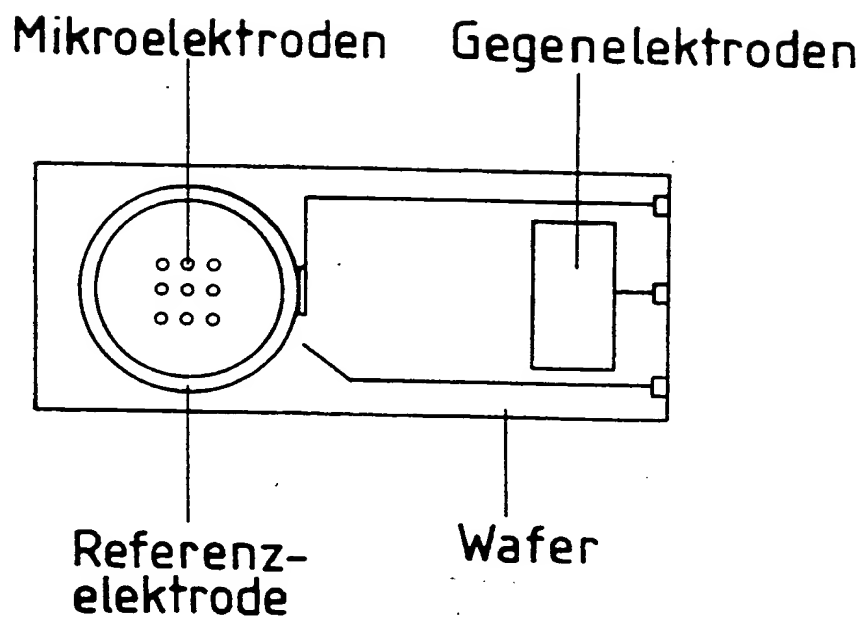
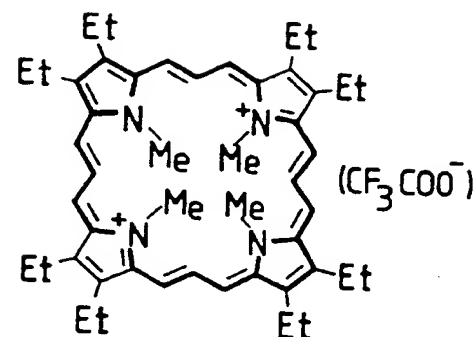
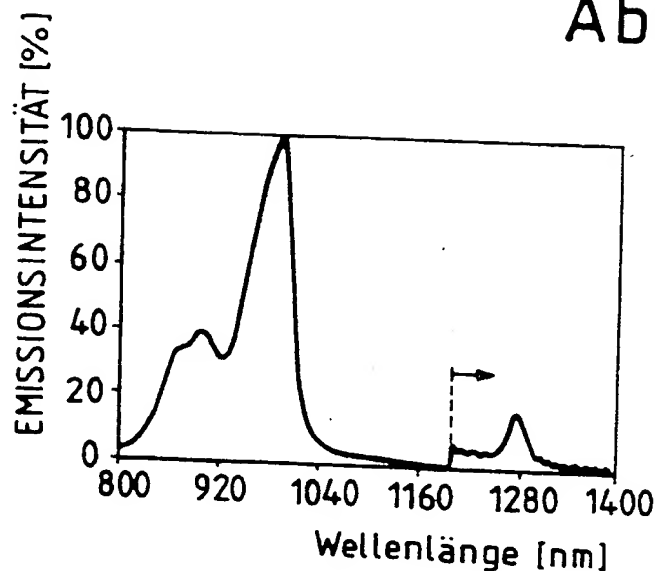


Abb. 3

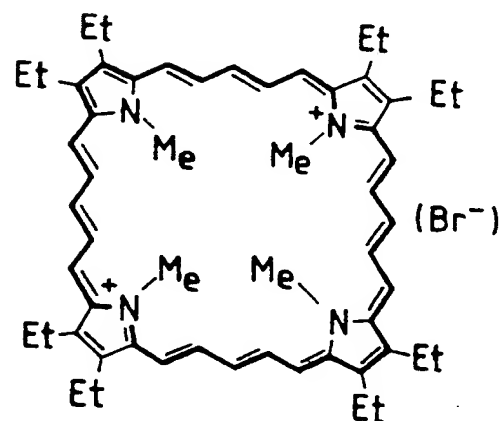
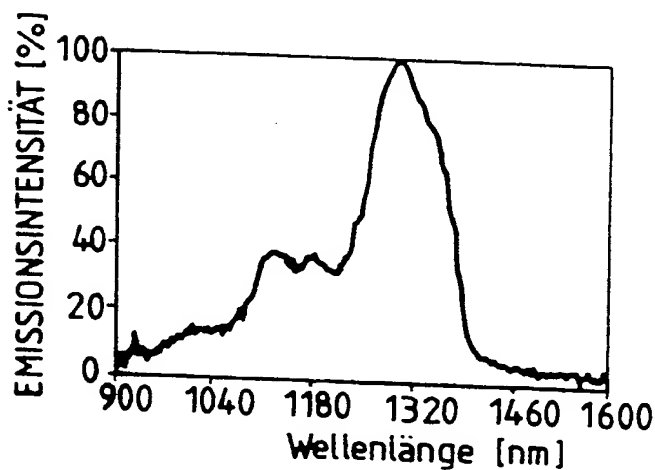
4/15

Abb. 4



Fluoreszenz-Spektrum: [26] Porphyrin-(3.3.3.3)

Anregungswellenlänge: $\lambda = 546 \text{ nm}$

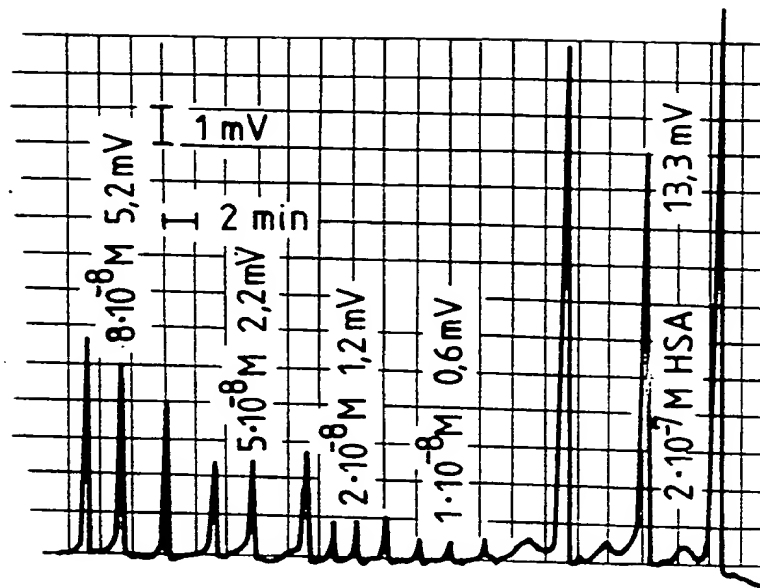


Fluoreszenz-Spektrum: [34] Porphyrin-(5.5.5.5)

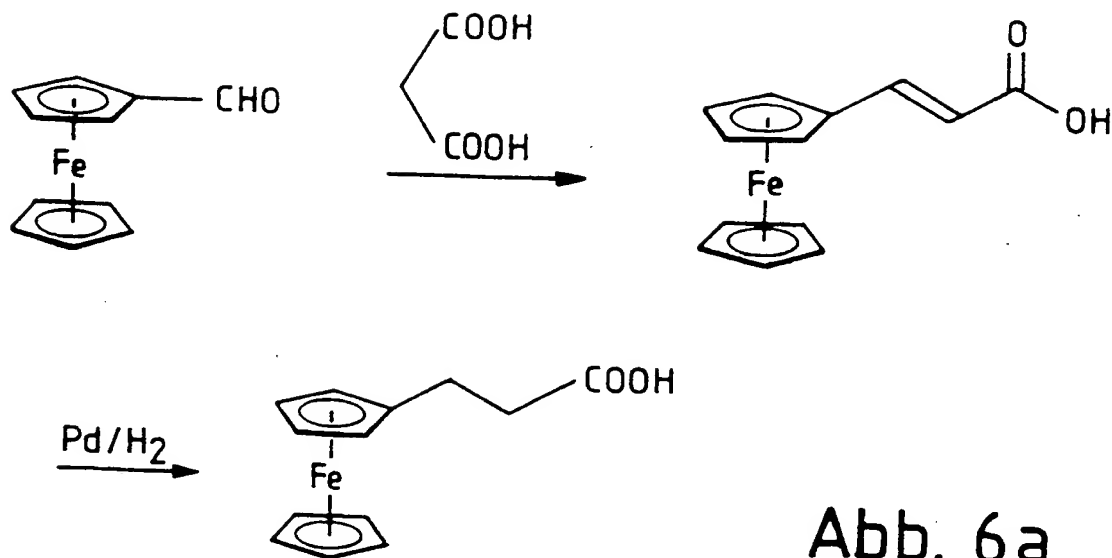
Anregungswellenlänge: $\lambda = 578 \text{ nm}$

5/15

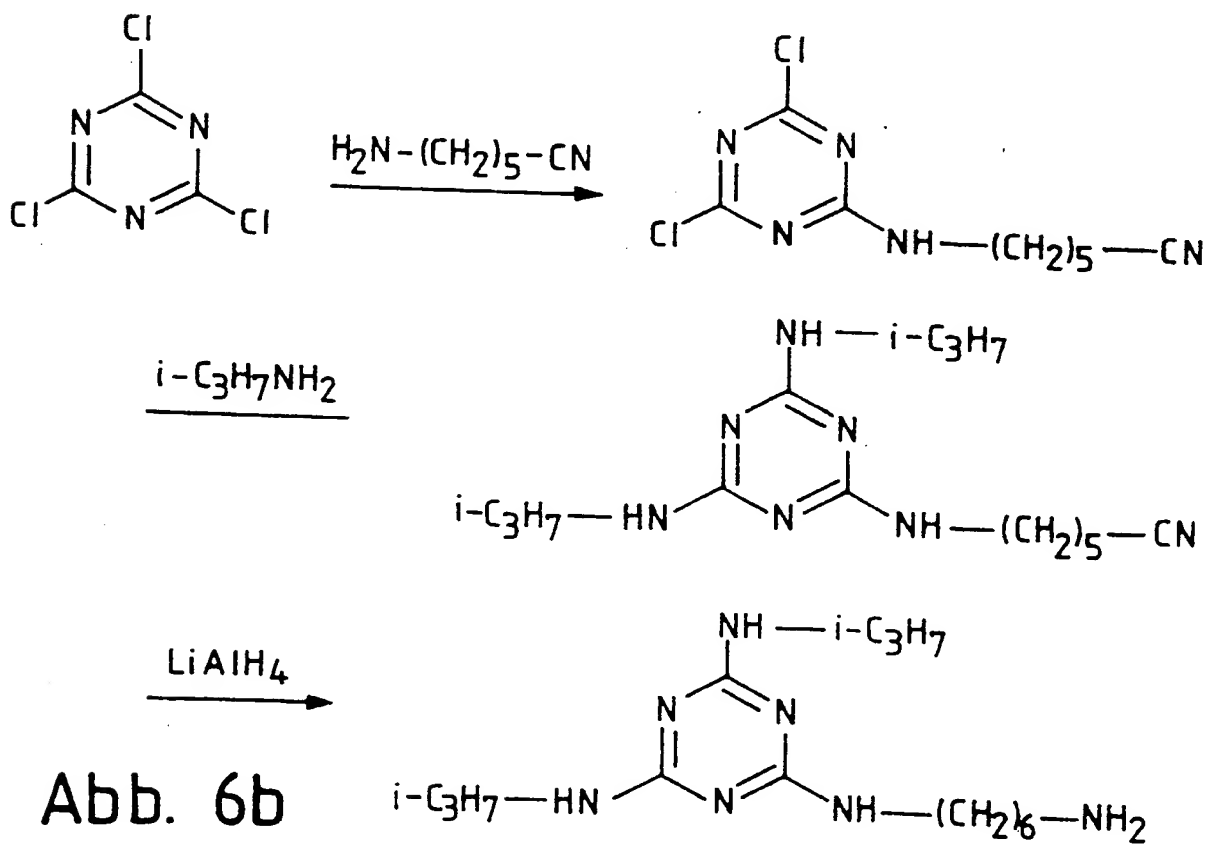
Abb. 5



6/15

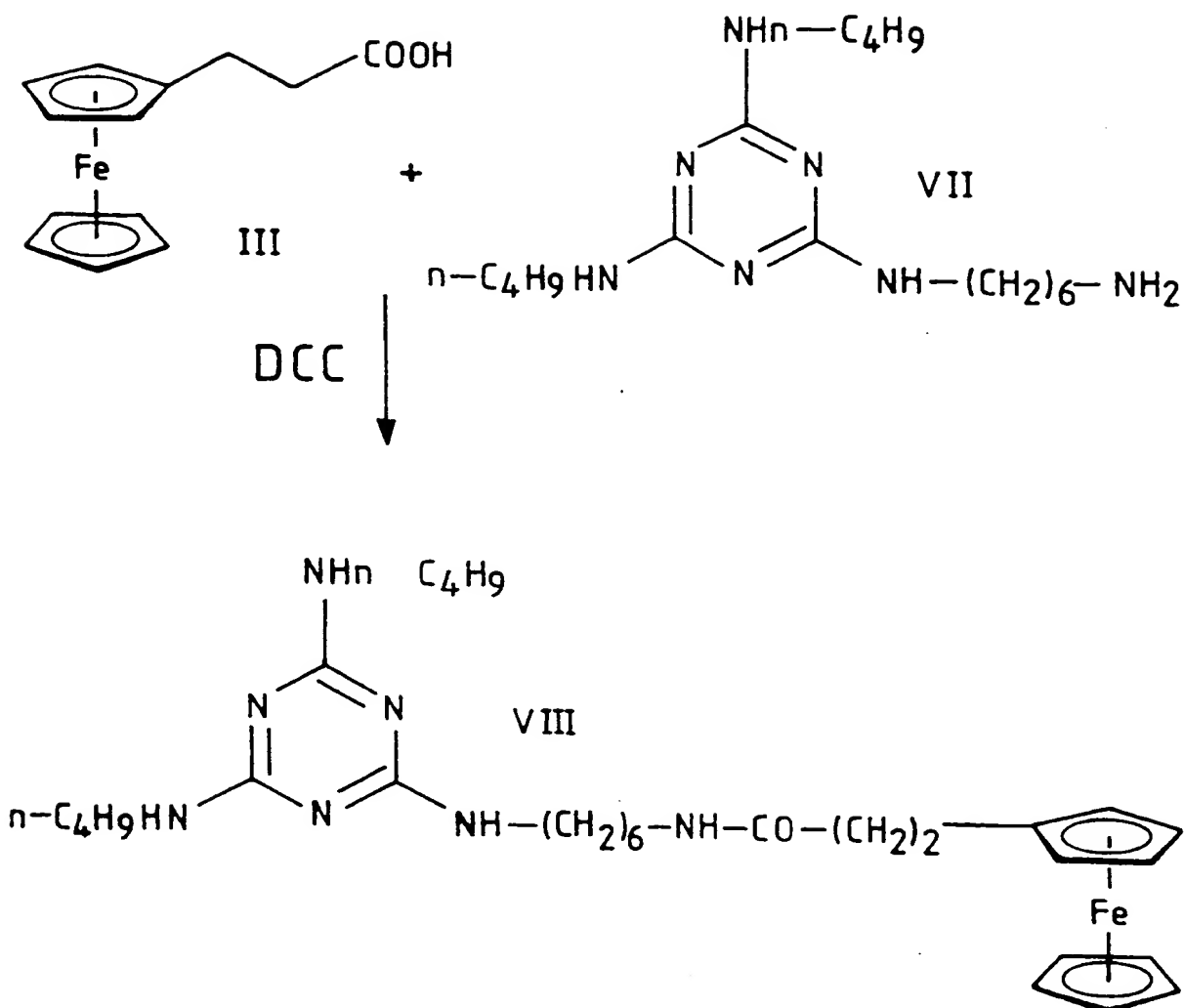


Die Synthese von 3-Ferrocenylpropionsäure



Die Synthese aminofunktionalisierter Triazinderivate

7/15

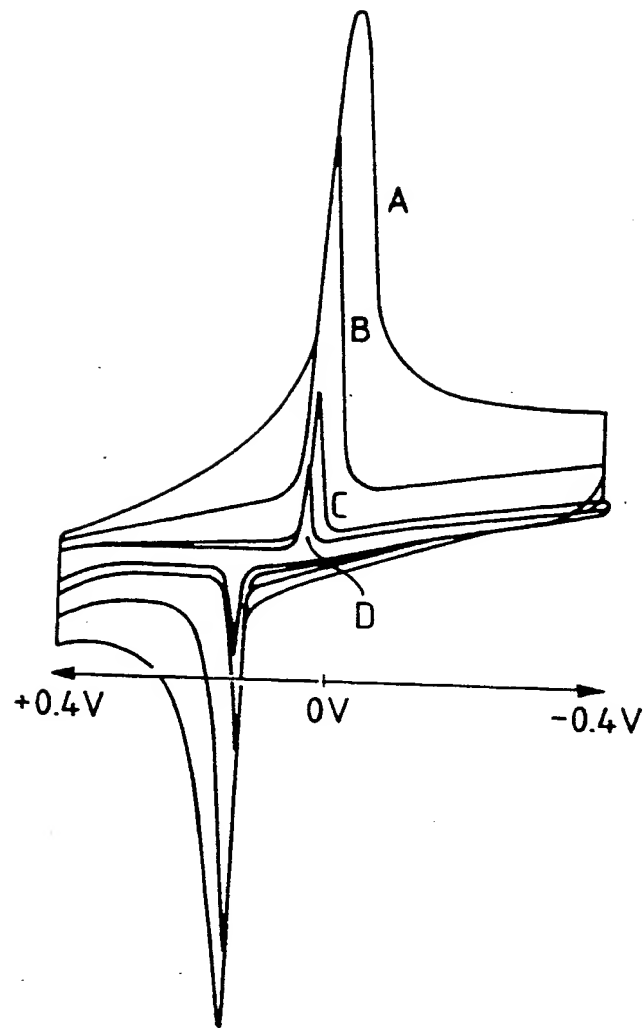


Die Umsetzung von 3-Ferrocenylpropionsäure mit einem aminofunktionalisierten Triazin zum Konjugat

Abb. 6c

8/15

Abb. 7



Stromstärke: $15 \mu\text{A}/\text{cm}$, Scanraten:

A: $160 \text{ mV}/\text{sec}$

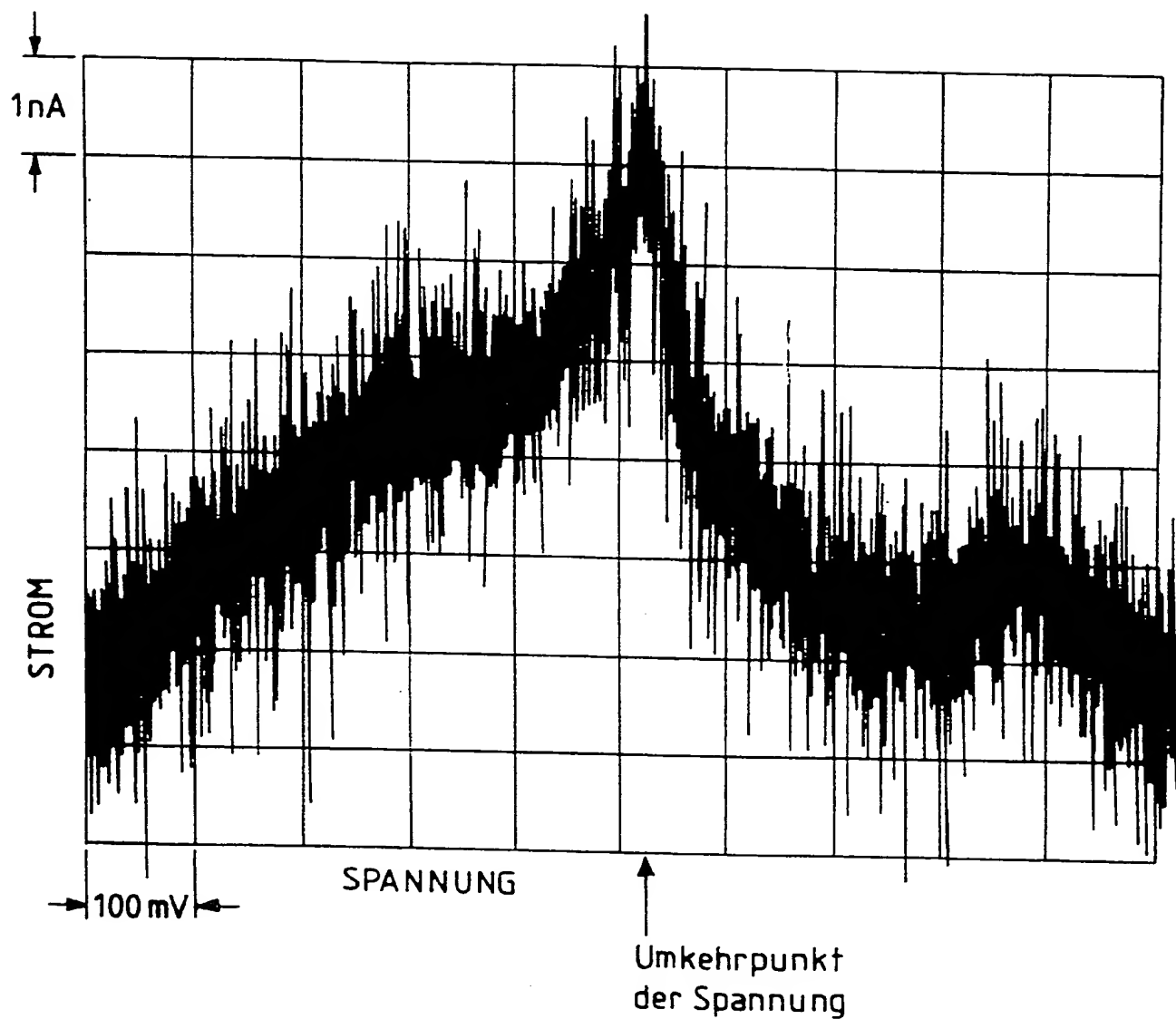
B: $80 \text{ mV}/\text{sec}$

C: $26.7 \text{ mV}/\text{sec}$

D: $13.3 \text{ mV}/\text{sec}$

9/15

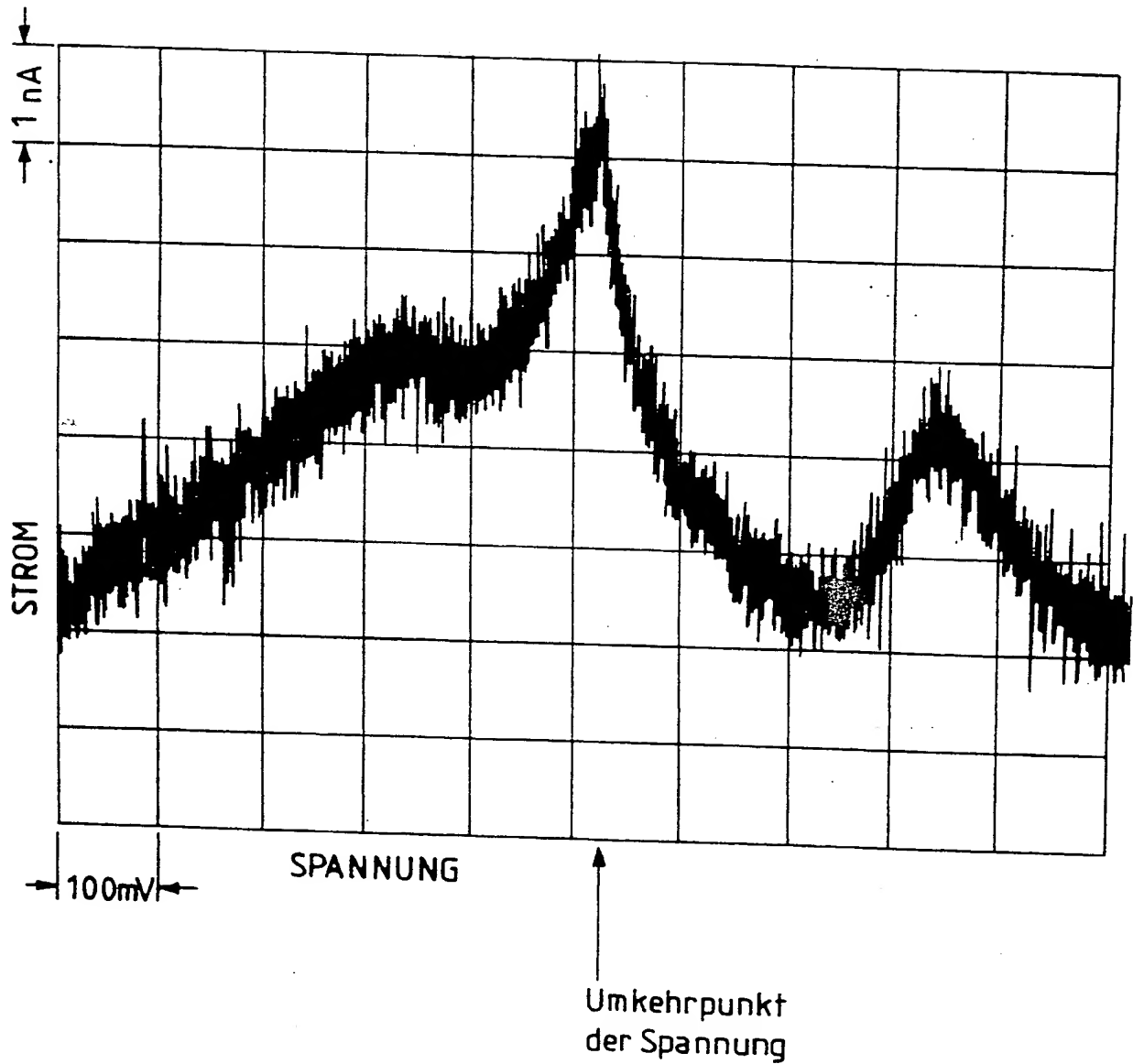
Abb. 8a



Methode: Cyclische Voltammetrie

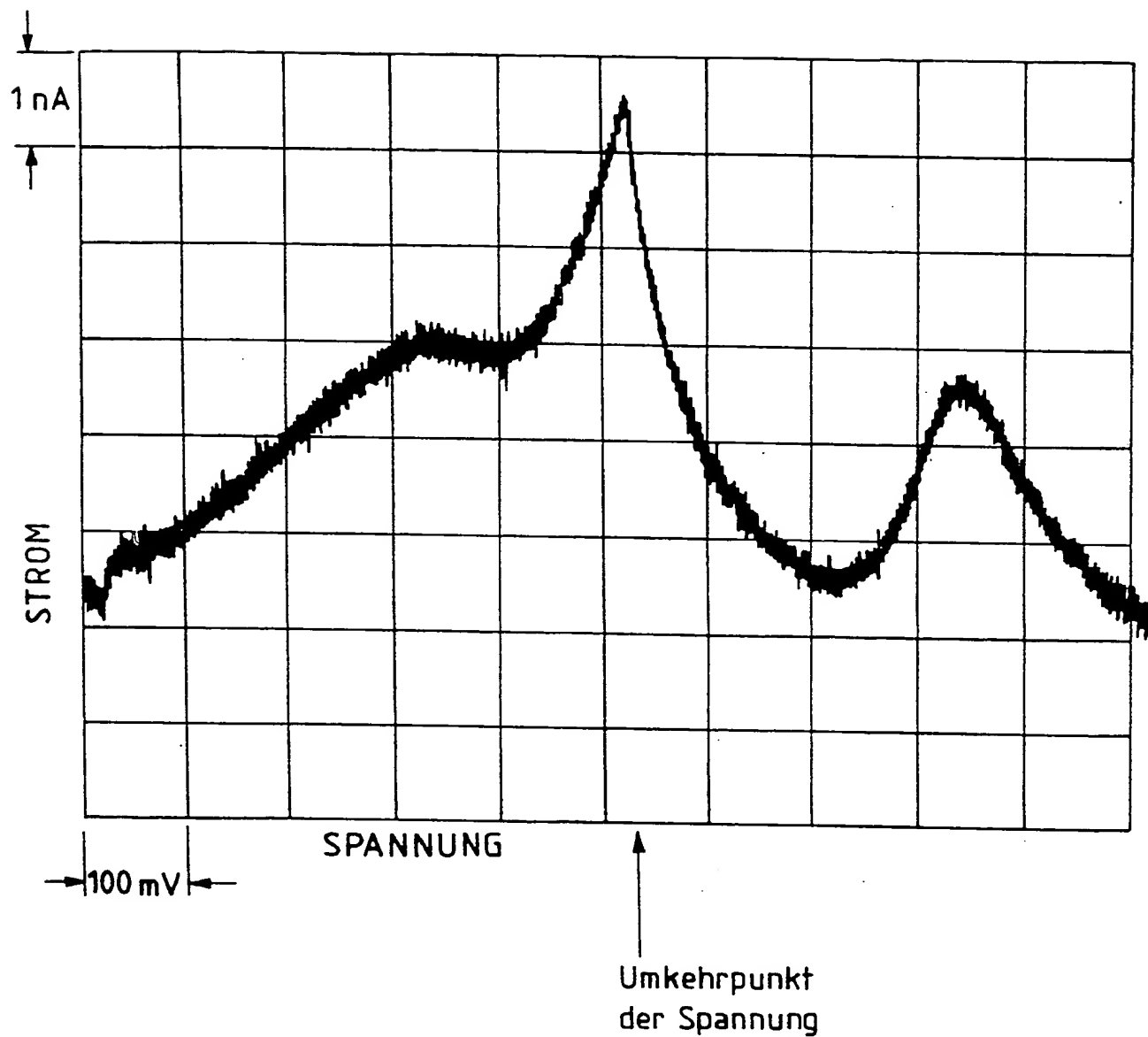
10/15

Abb. 8b



11/15

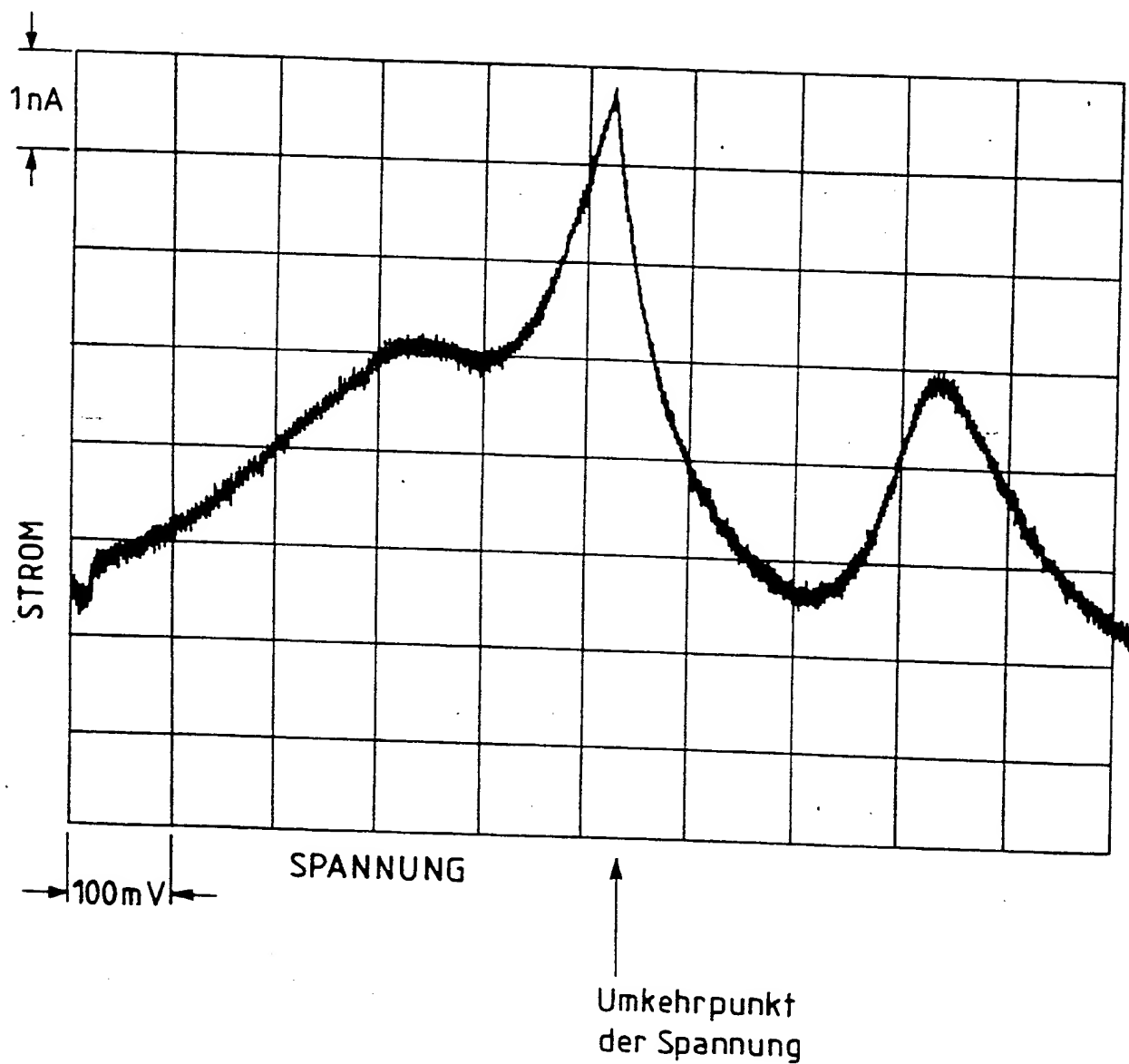
Abb. 8c



ERSATZBLATT

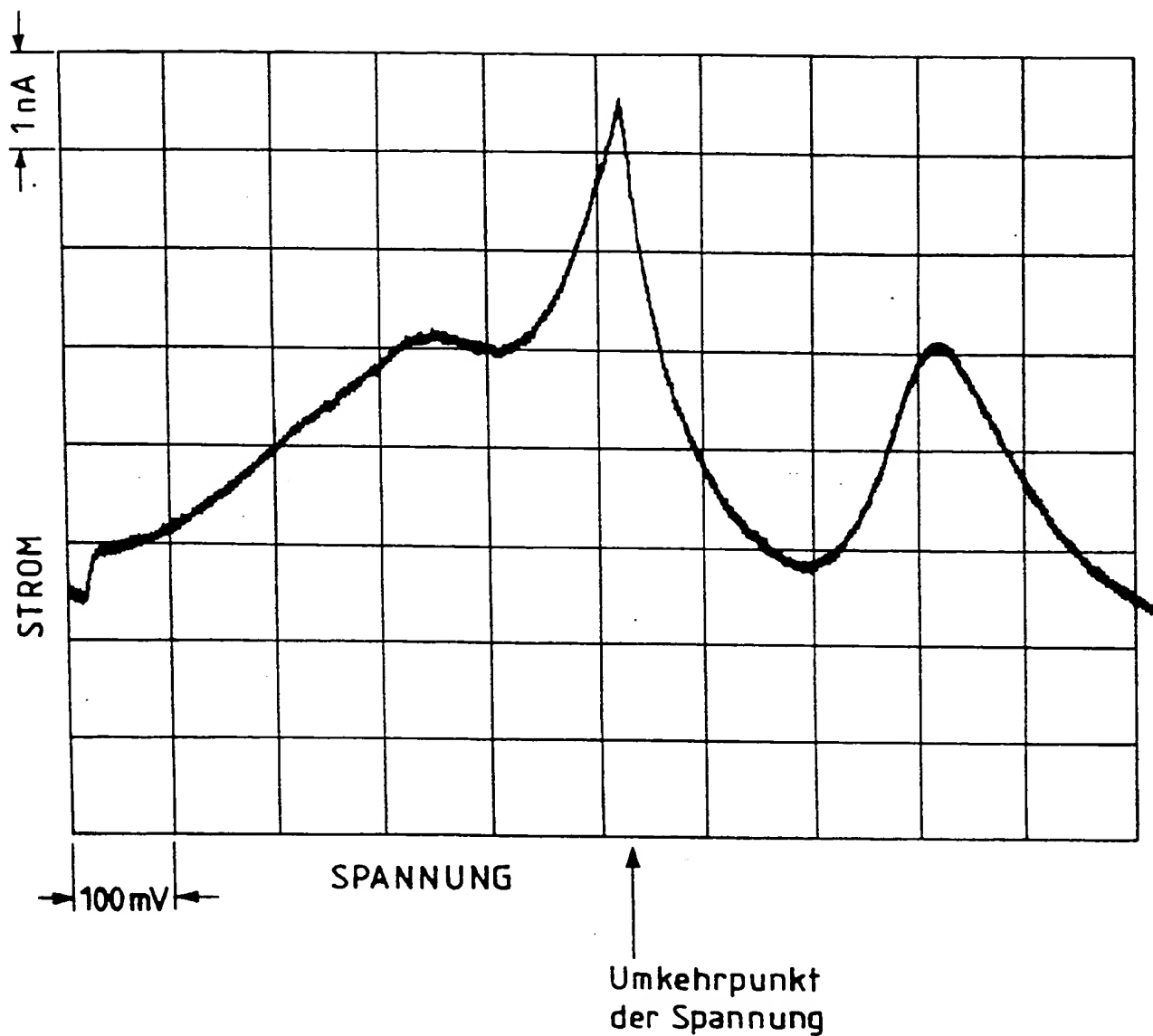
12/15

Abb. 8d



13/15

Abb. 8e



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01115

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5: G01N33/58; G01N33/53; G01N21/76; G01N33/543
G01N33/548; G01N33/538; G01N33/52; G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | US,A,4 997 526 (LOIS S. ROBBLEE) 5 March 1991 | 1 |
| Y | see the whole document | 2-22, 27, 28 |
| X | EP,A,0 201 339 (ULTRA DIAGNOSTICS CORPORATION) 12 November 1986 | 2 |
| Y | see the whole document | 2-28 |
| A | see the whole document | 1 |
| Y | US,A,4 859 583 (MICHAEL J. HELLER) 22 August 1989 | 2-14, 23-28 |
| A | see the whole document | 1 |
| Y | EP,A,0 046 004 (SYVA COMPANY) 17 February 1982 | 2-28 |
| A | see the whole document | 1 |
| X | EP,A,0 171 148 (UNILEVER PLC) 12 February 1986 | 2 |
| A | see the whole document | 1, 3-28 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 1993 (13.08.93)

Date of mailing of the international search report

25 August 1993 (25.08.93)

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9201115
SA 59971

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 13/08/93

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US-A-4997526 | 05-03-91 | None | |
| EP-A-0201339 | 12-11-86 | US-A- 4746631 | 24-05-88 |
| | | AU-B- 581082 | 09-02-89 |
| | | AU-A- 5730886 | 13-11-86 |
| | | JP-A- 61264261 | 22-11-86 |
| | | US-A- 4803170 | 07-02-89 |
| US-A-4859583 | 22-08-89 | None | |
| EP-A-0046004 | 17-02-82 | US-A- 4366241 | 28-12-82 |
| | | AT-T- 10548 | 15-12-84 |
| | | CA-A- 1174595 | 18-09-84 |
| | | JP-B- 3022589 | 27-03-91 |
| | | JP-A- 57063454 | 16-04-82 |
| | | JP-A- 3142361 | 18-06-91 |
| EP-A-0171148 | 12-02-86 | AU-A- 2967289 | 25-05-89 |
| | | AU-B- 583040 | 20-04-89 |
| | | AU-A- 4491085 | 10-01-86 |
| | | AU-B- 588245 | 14-09-89 |
| | | AU-A- 4491185 | 10-01-86 |
| | | AU-B- 581669 | 02-03-89 |
| | | AU-A- 4491385 | 10-01-86 |
| | | CA-A- 1231136 | 05-01-88 |
| | | CA-A- 1246891 | 20-12-88 |
| | | CA-A- 1261256 | 26-09-89 |
| | | EP-A, B 0170375 | 05-02-86 |
| | | EP-A, B 0170376 | 05-02-86 |
| | | EP-A- 0422708 | 17-04-91 |
| | | WO-A- 8600135 | 03-01-86 |
| | | WO-A- 8600141 | 03-01-86 |
| | | WO-A- 8600138 | 03-01-86 |
| | | JP-B- 3010902 | 14-02-91 |
| | | JP-T- 61502418 | 23-10-86 |
| | | JP-T- 61502419 | 23-10-86 |
| | | JP-B- 2024459 | 29-05-90 |
| | | JP-T- 61502420 | 23-10-86 |
| | | US-A- 4978503 | 18-12-90 |
| | | US-A- 4810658 | 07-03-89 |

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssystemen sind alle anzugeben)⁶

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 G01N33/58; G01N33/53; G01N21/76; G01N33/543
 G01N33/548; G01N33/538; G01N33/52; G01N21/64

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff⁷

| Klassifikationssystem | Klassifikationssymbole |
|-----------------------|------------------------|
| Int.Kl. 5 | G01N |

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

| Art. ⁹ | Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ |
|-------------------|--|----------------------------------|
| X | US,A,4 997 526 (LOIS S. ROBBLEE) 5. März 1991 | 1 |
| Y | siehe das ganze Dokument | 2-22, 27, 28 |
| X | EP,A,0 201 339 (ULTRA DIAGNOSTICS CORPORATION) 12. November 1986 | 2 |
| Y | siehe das ganze Dokument | 2-28 |
| A | siehe das ganze Dokument | 1 |
| Y | US,A,4 859 583 (MICHAEL J. HELLER) 22. August 1989 | 2-14, 23-28 |
| A | siehe das ganze Dokument | 1 |
| Y | EP,A,0 046 004 (SYVA COMPANY) 17. Februar 1982 | 2-28 |
| A | siehe das ganze Dokument | 1 |

¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. AUGUST 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25. 08. 93

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten

DÖPFER K.P.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

| Art ° | Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|--------|---|--------------------|
| X A | EP,A,0 171 148 (UNILEVER PLC) 12. Februar 1986 siehe das ganze Dokument ----- | 2 1,3-28 |

Formblatt PCT/ISA/210 (Zusatzbogen) (Januar 1985)

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RESEARCH-BERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9201115
SA 59971

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Research-Bericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

13/08/93

| Im Research-Bericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US-A-4997526 | 05-03-91 | Keine | |
| EP-A-0201339 | 12-11-86 | US-A- 4746631 | 24-05-88 |
| | | AU-B- 581082 | 09-02-89 |
| | | AU-A- 5730886 | 13-11-86 |
| | | JP-A- 61264261 | 22-11-86 |
| | | US-A- 4803170 | 07-02-89 |
| US-A-4859583 | 22-08-89 | Keine | |
| EP-A-0046004 | 17-02-82 | US-A- 4366241 | 28-12-82 |
| | | AT-T- 10548 | 15-12-84 |
| | | CA-A- 1174595 | 18-09-84 |
| | | JP-B- 3022589 | 27-03-91 |
| | | JP-A- 57063454 | 16-04-82 |
| | | JP-A- 3142361 | 18-06-91 |
| EP-A-0171148 | 12-02-86 | AU-A- 2967289 | 25-05-89 |
| | | AU-B- 583040 | 20-04-89 |
| | | AU-A- 4491085 | 10-01-86 |
| | | AU-B- 588245 | 14-09-89 |
| | | AU-A- 4491185 | 10-01-86 |
| | | AU-B- 581669 | 02-03-89 |
| | | AU-A- 4491385 | 10-01-86 |
| | | CA-A- 1231136 | 05-01-88 |
| | | CA-A- 1246891 | 20-12-88 |
| | | CA-A- 1261256 | 26-09-89 |
| | | EP-A,B 0170375 | 05-02-86 |
| | | EP-A,B 0170376 | 05-02-86 |
| | | EP-A- 0422708 | 17-04-91 |
| | | WO-A- 8600135 | 03-01-86 |
| | | WO-A- 8600141 | 03-01-86 |
| | | WO-A- 8600138 | 03-01-86 |
| | | JP-B- 3010902 | 14-02-91 |
| | | JP-T- 61502418 | 23-10-86 |
| | | JP-T- 61502419 | 23-10-86 |
| | | JP-B- 2024459 | 29-05-90 |
| | | JP-T- 61502420 | 23-10-86 |
| | | US-A- 4978503 | 18-12-90 |
| | | US-A- 4810658 | 07-03-89 |

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

EPO FORM P0473

TRANSLATION

Process and device for increasing the sensitivity and selectivity of immunoassays, molecule/receptor, DNA/complementary DNA and foreign molecule/host molecule interaction assays

Messerschmitt-Bölkow-Blohm GmbH
PCT Patent WO 93/21530

Abstract

A process is disclosed for carrying out particularly sensitive immunoassays and other assays that rely on molecule/receptor, DNA strand/complementary DNA strand and foreign molecule/host molecule interaction forces, with rapid and repetitive measurements of the current density or fluorescent light and double measurement and comparison/quotient calculation in at least two measurement zones or calibration in an analogous manner to the internal standard method, by using stable redox-or IR fluorescence-labelled analyte molecules in immunoassays and the like.

The invention relates to a generally applicable process consisting of a combination of selected steps and to devices for the extremely sensitive and interference-free determination of the concentrations of any antibody/antigen pair, complementary molecule/receptor pairs, complementary DNA strands and selective foreign molecule/host molecule pairs. It also relates to a device for increasing the sensitivity and selectivity of immunoassays, molecule/receptor, DNA/complementary DNA and foreign molecule/host molecule interaction assays.

The quantitative analysis of complex mixtures of substances using the highly selective binding of antibody to antigen (lock-and-key principle) and the formation of DNA pairs in the case of so-called DNA probes is a well-established analytical method in biochemistry and clinical chemistry and is correspondingly widely used. In general, competitive tests with labelled antigens, antibodies or DNA molecules are used. In the radio immunoassay (RIA), the antigen added to the measurement solution (or the antibody molecule in the sandwich method) is radioactively labelled. In the enzyme immunoassay (EIA, or the heterogeneous enzyme-linked adsorbent assay, ELISA), a marker enzyme is bound to the labelling molecules concerned. These labelled molecules compete with the unlabelled molecules to be measured (the substance to be determined = analyte) for binding to the antibody (or DNA sequence) that is usually bound to a support, so that the unknown amount of antigen (DNA type and amount) can be determined if a test with an antigen (DNA molecule) of known concentration is carried out at the same time. In this method the measurement signals are inversely proportional to the concentration. Labelled antibodies are used in the so-called sandwich test. These bind sandwich-like to antigen molecules that themselves have previously been bound in a concentration-dependent manner to antibodies bound to a support.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The highly specific binding of two complementary molecules naturally also permits the inverse process of the quantitative determination of the larger partner (analysis for the antibody or receptor, or of the complementary DNA molecule (or biosurface) that has a DNA sequence complementary to the labelled sequence, at least in a partial zone) and is therefore the most important biochemical analytical method. Now that it has become possible to produce monoclonal antibodies in any quantities for smaller molecules (haptens) as well, these immunological methods are becoming increasingly important in environmental analysis. For example, the use of monoclonal antibodies to the various dioxins can reduce the total cost of analysis considerably, as the very expensive GC-MS analysis need only be carried out if the immunological test gives a positive result (screening).

The immunological methods that have by now become traditional (RIA and EIA or ELISA) have substantial disadvantages that are well enough known. Either there are disposal, dispatch or storage problems because of the use of radioactive material, or it has to be assumed that the immunological reaction will be influenced by the enzyme molecule, which generally has a much greater volume than the relatively small antigen molecule. Enzyme-labelled antigen or antibody molecules (or one of the partners of molecule/receptor, foreign molecule/host molecule or DNA/complementary DNA interaction methods) have all the disadvantages of enzyme methods. The lifetime of the enzyme is limited and with unknown environmental matrices the enzyme reaction (biocatalysis) is extremely sensitive to interference from inhibitors or enzyme poisons (e.g. heavy metals), so that false results are obtained. The enzyme-labelled compound must generally be stored cool for reasons of stability. This declining activity means that additional calibration steps are needed, and the principles of GLP (good laboratory practice), which must be adhered to in quantitative analyses, require reserve samples and so a certain quantity of the expensive enzyme-labeled compounds. Phase separation is also necessary; a substrate has to be added, which makes handling very complicated. The operating steps required generally take some hours. The so-called homogeneous enzyme immunoassays (EMIT) do not require phase separation; they work competitively and are suitable only for small antigen molecules.

There has been little prior work on a simple and generally applicable use of selective molecule/receptor interaction forces, DNA pair-forming reactions or the equally selective foreign molecule/host molecule relationships of supramolecular chemistry in analytical chemistry for quantitative determination or even the constitution of corresponding sensors.

The advantageous constitution of a simple and cheap electrochemical measurement system, whose requirements in terms of apparatus are least for potentiometry or amperometry, generally fails in the face of the fact that the substance to be determined (the analyte) is not present in the form of a potential-determining ion, but as a neutral molecule, or cannot be made to undergo a selective electrochemical reaction. The use of optical methods (spectrophotometry, the measurement of fluorescence, ellipsometry, surface plasmon resonance spectroscopy, the evanescent wave method, etc) to measure the above-mentioned specific molecular interactions has been described. Some can detect the immunological reaction even without a labelled partner from the change in the refractive index at a phase boundary, but have great problems with small analyte molecules (which are usual in environmental analysis) at trace amount levels (< 1 ppm), as the non-specific binding of interfering substances that are also present in real samples, usually in large excess relative to the analyte, limits sensitivity.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Optical methods with the usual fluorescent labels, which need an excitation wavelength in the UV or visible range of the spectrum, require a high outlay on equipment, which stands in the way of widespread routine use. The efforts that have to be put into stabilising the light source, producing monochromatic light with the aid of a monochromator free from scattered light, to exclude the effects of extraneous light, to improve sensitivity, and so on, require modifications to equipment that are very complex and therefore expensive. Furthermore, many substances in typical biological matrices other than the fluorescent groups of molecules of the marker (e.g. tryptophan) are excited at the same time, so that their fluorescence cannot be distinguished from that of the labelling molecule, which greatly impairs the limit of detection. These problems can only be overcome by labelling with special fluorescent markers that work on the delayed fluorescence principle, but this method requires expensive equipment and is used virtually only in so-called enhancement steps to increase sensitivity - but this means an additional operation.

The German patent application DE 3916432 A1 (1990) describes a potentiometric method for detecting an immunoreaction between unlabelled complementary partners that can also be used on smaller analyte molecules in the range below 1 ppm.

In the case of immunoassays that work in the same way as affinity chromatography and in which there is a displacement reaction with a labelled analyte molecule, the state of the art hitherto has described only measurements with through-flow cells in which the interaction time (= pure measurement time) with the measuring quantities (light, current, etc) is predetermined by the flow rate and is relatively short (only a few seconds). Especially with continuous flow measurements, such a short measurement time does not permit a high degree of electronic damping, so that the signal-to-noise ratio (S/N ratio), which falls away rapidly in the most sensitive regions, sets limits to the electronic or optoelectronic amplification technique. Repeat measurements, which have similar beneficial effects on the S/N ratio when means are obtained, are also impossible when the labelled substance passes rapidly through the through-flow detector. Moreover, repeat measurements require a reference point, i.e. a background measurement (blank value), for which an appropriate device is needed.

Neither is there anything in the state of the art on a simple and quasi-automatic separation of the sample matrix with interfering components also emerging from the immunological reaction zone, except in connection with the heterogeneous ELISA techniques, in which an additional separation step is prescribed. This is of central importance for correct measurements and is an essential prerequisite for repetitive measurements, with which erroneous measurements are also cumulative.

There has not yet been any description equating immunoreactions with receptor reactions or DNA formation and foreign molecule/host molecule inserts with the ability to recognise molecules along the lines of the generally applicable arrangement of the invention that can be used with sensors, as labelling with an enzyme of large volume interferes very markedly with these selective binding reactions (steric hindrance). This does not apply to the relatively small redox systems or IR-fluorescent molecules.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

There is therefore a need for a generally applicable process and a device that avoids the known disadvantages of direct-reading processes and processes with labelled immunological partners (all current immunoassays).

The task of the invention, to increase the sensitivity and at the same time to reduce the known cross-interferences in all traditional immunoassays and like processes, is achieved in particular by a selected combination of several process steps in accordance with Claim 1. In order to achieve the required extremely low limit of detection in the trace analysis range, the invention uses repeatable electrochemical and optical methods of measurements together with a special method of electronic signal processing (signal averaging) and corresponding measurement arrangements instead of the highly susceptible and imprecise enzymatic signal amplification methods.

In the process of the invention, the immuno-partners to be determined (antigen or antibody, molecule or corresponding receptor, foreign molecule or corresponding host molecule, DNA strand and the corresponding complementary sequence) are bound in a stable manner (i.e. covalently) either with a stable redox system or with a stable compound that is fluorescent in the infra-red region (> 700 nm). These two types of marker molecules were selected after extensive preliminary experiments and on the basis of certain criteria that will now be disclosed. Inorganic or organic systems with high standard exchange current densities at inert metal electrodes are suitable redox systems, while molecules that can be excited to fluorescence in the far infra-red (> 800 nm) with cheap laser diodes are the most advantageous labelling molecules among the fluorescent markers.

The process of the invention is simpler, more sensitive, quicker, more correct and therefore ultimately cheaper than all immunoassays that have been described hitherto. The direct, extremely sensitive and rapid measurement of smaller antigens, which the processes disclosed in the above-mentioned documents can achieve only inadequately or not at all, is a further advantage. Precisely this field offers great scope for the application of the new molecular analysis (analysis of harmful substances), especially in the field of environmental protection or in the monitoring of maximum concentrations in the workplace, as well as in clinical chemistry (medical diagnosis, pathology, forensic medicine).

The process of the invention can be carried out in different ways:

In an advantageous version the labelled analyte molecule may be first bound to the immobilized partner. On contact with the bound, labelled partners, the unlabelled analyte molecule displaces its labelled counterpart (redox- or fluorescer-labelled antigen or antibody molecule = labelled analyte molecule) from the surface bond and the latter is carried away by a stream of liquid.

In another version the labelled analyte molecule is added to the sample in a known ratio and the mixture is allowed to interact with the immobilized immuno partners (including all the complementary systems mentioned above). Different amounts of the labelled analyte molecule are bound competitively, depending on the concentration of the analyte, there being an inverse relationship. In both versions, the labelled analyte molecules that are not bound or that are released are collected in an extremely small space by the corresponding

THIS PAGE BLANK (USPTO)

immunological (complementary) partner, which is present in an immobilized or locally confined and fixed form, concentrated up and freed from adherent sample matrix by rinsing.

Again, in the form of the device of the invention in which there is an electrochemically and optically accessible surface, the measurement may be made on the part that does not correspond to the collected eluate. In competitive tests in which the surface of the device is covered with immobilized partner molecules saturated with labelled complementary molecules before contact with the sample, the reduction in the intensity of labelling, which is proportional to the amount of analyte, can also be measured. In the other form of competitive tests in which labelled and unlabelled analyte molecules are added together to the immobilized complementary molecules with free binding sites, the increase in labelled molecules in this surface zone is inversely proportional to the concentration of analyte. In this case the amount of labelled molecules that pass through the immunogenic zone unbound is directly proportional to the amount of analyte. In making measurements on accessible surfaces with an immunological-analytical device of this kind, it is therefore possible to obtain the analytical result in duplicate (with redundancy). This possibility of determination in duplicate is new and considerably improves the reliability of the whole immunoassay. Errors and interference can be discovered at once from the failure of the two measurements to correspond.

The process of the invention includes a double determination of the analyte. For a displacement assay, the decrease in the signal intensity integrated over the immunogenic zone (proportional to the concentration) must correspond to the increase in the "molecule trap" zone (see Figure 2). The same also applies to the method in which the labelled analyte molecule is added to the sample in a known ratio before each analysis. The trapping of the unbound labelled and unlabelled analyte molecules in a special trapping zone enables the concentration of unlabelled analyte molecules in the sample to be deduced directly from the concentration of labelled analyte molecules that can be measured in that zone. The higher the concentration of labelled analyte molecules after passing through the immunogenic zone, the higher the concentration of the analyte in the sample.

A further advantage of the invention (more sensitive and freer from interference than previous methods not based on enzymes) is the separation off of the matrix substances that are not specifically bound before the actual measurement and the collection or accumulation of the labelled molecules on a flat surface on which unlabelled partner molecules with free binding sites are bound, so that they specifically bind the labelled partners that have passed through the other immunological binding zone without being bound or have been released from there by unlabelled analyte (displaced from the bound state). The labelled analyte molecules bound to a flat surface, the amount of which provides, after calibration, information on the amount of (unlabelled) analyte molecules present in the sample, can then be determined electrochemically or optically, depending on the type of labelling, allowing both long measurement times with high damping and cyclic or repetitive measurements with electronic (or computer-aided) averaging. The laws of statistics show that the signal-to-noise ratio can be improved by a factor equal to the square root of N by making N measurements.

Other collection phases may also be used instead of the specifically binding immuno partner molecules with free binding sites as selective "molecule traps" after the primary competitive immunoreaction. In the case of lipophilic analyte molecules, it is sufficient for there to be a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

zone through which the sample flows that is saturated with oil or wax (or PVC plus a plasticizer). Alternatively, a material such as is commonly used in reversed phase chromatography may be used (e.g. RP-18 stationary phase). The latter is particularly appropriate when analyte molecules present as ions have to be retained. In this case an appropriately charged, lipophilic counter ion is added to the mobile solution. This results in ion pair binding in the oil or fat, making the passage of the labelled analyte molecules through this molecule trapping zone difficult. When there is a flow of carrier solution, they will accumulate towards the end of the lipophilic zone and so be made accessible to the sensitive measurement.

The use of test-strip-like chromatographic material gives a particularly simple and elegant device in connection with this aspect of the invention. The source of the material here can be either paper chromatography (extended to include membrane filter materials based cellulose acetate or nitrate or the like) or thin-layer chromatography (see Figure 2).

The production of the devices of the invention is simple and rational. For applications of the process disclosed here in the field of environmental analysis, the appropriate polyclonal or monoclonal antibodies or F_{ab} fragments are applied to over 75% of the test strip surface using known binding techniques (covalent immobilisation by means of spacer molecules and F_c -part binding components) in the correct orientation (binding sites out). After these macromolecules that recognise the analyte have been fixed on the surface of the test strip, the start region is dipped in a solution containing only labelled analyte molecules.

This ensures that all the binding sites are occupied by these labelled analyte molecules.

The length of this immunogenic zone corresponds to the size of the measurement zone. This is followed by thorough rinsing to remove labelled analyte molecules that are bound purely by adsorption. The rest of the test strip now contains the antibody molecules that recognise the analyte (or, in the case of the other analogous reactions, the corresponding DNA's or host molecules) with free binding sites and serves as a molecule trap for the subsequent measurement. This collection zone may advantageously be terminated by a thin zone with dialysing properties.

The result of this is that, although the mobile base electrolyte (determined by the nature of the antibody molecule) can pass through this zone, the larger, labelled analyte molecules are retained and therefore accumulate in an extremely small zone. This arrangement can also be used in transparent glass tubes or cheap plastic tubes filled with the chromatographic material concerned. If these tubes are closed off with the dialysis membrane no other collection zones are required. All that is needed is to ensure the unimpeded access of the optical beams, which are here preferably axial and not lateral to the tubes. In the case of redox-labelled analyte molecules, this dialysis film is fitted so that it can be taken out and the inside of it with the collected labelled analyte molecules released in the primary immuno zone in proportion to the analyte made accessible to the planar electrochemical cell. The latter may of course also be fixed to the inside of the dialysis membrane in advance by microelectronic methods.

The electrode surfaces are miniaturized and require only minimal amounts of noble metals, so that here too the test-tube like device may be disposed of after a single measurement.

The tube arrangement covers a wider concentration range of the analyte, i.e. the calibration curve moves into the saturation range later than is the case with a planar arrangement, because of the larger amount of immobilized analyte-recognising and -binding antibodies.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The evaluation can also be made on the regions of displacement (or integrated over them) (see Figure 2). A cheap laser diode scanner may be used for this purpose.

A free end zone, with evaporation of the solvent, may also be used in the arrangements discussed above to accumulate the labelled analyte molecules that are released or not bound, in both the displacement method and the competitive method (addition of the labelled analyte molecules at the beginning of the assay). The stable redox marker molecules and the IR fluorescence molecules selected are able to withstand increases in temperature. Given compatibility with the antibodies, more easily evaporated solvents may be used to improve efficiency, further addition after the primary immunogenic zone also being possible. It is important that evaporation to concentrate the labelled molecules is confined to a small zone (area), because this ensures that the solvent transports the molecules to be detected to that location before it is evaporated off and leaves the molecules behind there. Figures 1 and 2 illustrate the various possible arrangements by means of sketches.

The electrochemical method of measurement optimized in accordance with the invention is a cyclic voltammetric method in association with a stable redox, the latter being distinguished from all possible redox systems in that it has an especially high standard exchange current density. With thin-film measurement cells cyclic voltammetry guarantees that there is no net turnover, i.e. consumption of the measured substance: it is merely always oxidized and reduced. In accordance with the invention, the highest sensitivity of measurement is achieved when the range of potential in which the working electrode(s) is/are operated cyclically includes the half-step potential of the redox marker (~200-600 mV). At high rates of change of potential ($>> 500$ mV/sec scan rate), working electrodes > 10 mm give anodic and cathodic current peaks that are proportional to the concentration of the redox system. The higher the scan rate, the larger the current peaks, which is equivalent to an increase in sensitivity. When systems with the highest standard exchange current densities (e.g. ferrocene compounds, ruthenium complexes, hexacyanoferrate II/III, I/I, etc), are used, redox systems not completely eliminated from the sample matrix cause much less interference when short cycle times (rapid voltage rises) are used. The best reversible redox systems permit of more than 1000 cyclic voltammograms per second (1000 Hz). Residues of less reversible redox systems from the sample matrix that might interfere cannot be transformed electrochemically so quickly and therefore produce no measurement signal (flow of current).

Alternatively, other electrochemical methods that involve no consumption or net turnover of the reacting system may be used, i.e. pulse voltammetry or differential pulse voltammetry or square-wave voltammetry are also suitable, but for reasons grounded in principle cannot be operated with such a quick cycle time.

A further stage in the process of the invention that advantageously leads to the desired great increase in sensitivity lies in a special method for compensating for the capacitive current that represents the background to the signal and increases with fast working electrode potential scan rates.

This is done using a computer-controlled evaluation system operating like a scan recorder through the agency of a rapid AD-converter. Compensation for the non-faradaic background current, which also makes a major contribution to increasing sensitivity, can be effected in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

two ways, which can be used individually or together. With working electrodes having a diameter greater than 10 mm the channel assignment of the scan recorder is reversed when the turning point in potential is reached, as if the voltage on the working electrode were being plotted against the current flowing (C-V diagram) with an X-Y recorder. As this is equivalent to a simple addition of the signals, equally large cathodic and anodic currents cancel each other out for each measurement channel (time window or potential). Only for the peak currents, which are separated by about 60 mV is this not the case.

A further step that is a major advantage in achieving the goal of this invention is the electronic averaging that is only made possible by rapidly repeated measurements without consumption of the substance being measured. A signal averaging device also drastically increases the signal-to-noise (S/N) ratio while doing this, as several thousand cycles can be averaged. Since it is easy to scan far more than 100 potential cycles per second ($\gg 100$ Hz) with reversible redox systems, the signal-to-noise ratio is improved by a factor of 10 in only 1 second, for example. Measurement times corresponding to those for immunoassays with enzyme labels give improvements of several orders of magnitude in this S/N ratio, which determines the limit of detection, without the disadvantage in this case that the sensitive protein molecules (enzymes) interfere. The second method for suppressing the interfering capacitive background current in cyclic voltammetry uses an ultramicroelectrode array with the diameters of the individual electrodes less than 10 mm as working electrode. In this case there are no longer anodic and cathodic peak currents, but a current step with well-defined plateaus. As in polarography, the step height is proportional to the concentration of the electrochemically transformed redox system (marker molecule). For this purpose the device of the invention uses a planar array of about 2000 individual electrodes 3 mm in diameter, in which the reference and counter electrodes are already optimized and integrated in the surface. Only one of many possible geometric arrangements proved to be suitable (see Figure 3).

The new application of cyclic voltammetry to achieve extremely high sensitivities of measurement with redox systems or marker molecules with redox groups is made possible by the fact that the substance being measured is not used up in the course of alternating oxidation and reduction. The invention solves the problem of the diffusion away of the redox system by choosing a thin-film cell arrangement, in which the working electrode(s) and the counter and reference electrodes are pressed against the surface with the redox-labelled partner molecules that is moistened with the base electrolyte. The unlabelled partner molecules that bind the redox-labelled molecules may also be immobilized on or immediately next to the electrode surface. The cyclic procedure is necessary for limits of detection below 1 ppb (redox system), as all molecules must if possible be detected electrochemically at such extremely low concentrations. A current of 1 mA then corresponds to a turnover of substance of about 10^{-10} mol/sec. At present, good electrochemical cells permit reliable current measurements in the nA range, which corresponds to a turnover rate one thousand times smaller. Signal averaging now makes pico- and femto-ampere currents measurable, leading to turnover rates of 10^{-16} and 10^{-19} mol per sec, respectively.

In the case of optical detection, the desired increase in sensitivity is achieved by a combination of several, at least two, process techniques. The first technique is to use label molecules that absorb strongly in the IR and fluoresce in the farther IR, as this eliminates the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

interfering background fluorescence of certain protein molecules (e.g. with biological matrixes), and cheap laser diodes are particularly advantageous as excitation sources of high spectral light density. The low beam convergence of the laser light emitted permits especially precise delineation of the measurement window. Another technique is the use of fluorescent labelling molecules whose fluorescence decays especially slowly, so that this fluorescence can be clearly distinguished from the rapidly decaying fluorescence of the interfering molecules in the sample matrix. In contrast to a commercially available arrangement in which the exciting light is simply cut off by a shutter and the actual measurement of the fluorescent light does not start until after a few milliseconds (after the interfering fluorescent radiation has completely decayed) and is obtained by integration over a certain time, the evaluation in the process of the invention is obtained by an electronic method of allowing for the slower decay time that gives a direct and more rapid measurement. This is done by using a lock-in amplifier, which enables amplification that is selective as to frequency and phase. Here, the interfering fluorescence with a rapid decay time is suppressed by an appropriate choice of phase angle on the instrument. The advantage of this method over the counting rate method (photon counting) of the commercial version is the higher sensitivity, because the frequency-selective amplification amplifies only a fraction of the generally white electronic noise of the photo-receiver and because it is possible to work at higher light chopper frequencies, which drastically increases the display speed, so that continuous flow measurements, such as are usual in FIA, can still be carried out with satisfactory sensitivity.

These and other advantages are obtained in the invention by:

- A A kind of affinity chromatography column or a surface of a support of any kind with immobilized partner molecules to the molecule to be determined (analyte) that is open or accessible to optical and electrochemical measurement;
- B A similar "collecting surface", also accessible to measurement, for released labelled analyte molecules (in the case of a displacement reaction by unlabelled analyte molecules on the above column or surface that is occupied as completely as possible with labelled immunogenically bound analyte molecules;
- C. A flat electrochemical measurement cell in accordance with the invention in a potentiostatic circuit consisting of two or three electrodes with one or more working electrodes that performs cyclic voltammetry in the electroactive range of the redox system concerned (repetitive oxidation and reduction) and that can be brought into direct contact with the "collecting surface" or the [surface] mentioned in A.
- D. A fluorescence arrangement that excites fluorescence at emission wavelengths $> 700 \text{ nm}$ and that oscillates rapidly between an unlabelled background and the sites where the optically labelled analyte molecules are retained on the surfaces concerned (alternatively, it is possible to use fluorescent labels that permit the method of time-delayed fluorescence, in which case the direct and rapid measurement is carried out by an electronic phase-selective amplifier that can also oscillate rapidly between an unlabelled and a labelled background with the aid of light guides).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- E. An electronic signal averaging device or a computer-aided addition of signal/time curves (time proportional to the voltage in electrochemical detection or to the site of measurement in optical methods). Any statistical electronic noise averages out to zero in the ranges of highest sensitivity.
- F. If the evaluating measurement determines the change in both the labelled analyte molecules in the primary immunogenic zone and in the collection zone, a sort of internal standardisation may be carried out by finding the quotient in addition to a double measurement. This improves the reliability of the measurements in a similar way to the internal standardisation of emission spectroscopic methods.

The surface with the immobilized immunological partner molecule to the analyte should be heavily loaded in the interests of obtaining a wide measurement range. The molecule concerned must also be immobilized in the correct orientation (with the epitope region outwards). This can be achieved, for example, by using an appropriate electrical field (or current) at the phase interface between the support surface and the measurement solution. This ensures that the partner is immobilized in an oriented way without the need for expensive special substances (like the usual spacer molecules). Oriented immobilisation combined with a high density of immobilisation ensures a high sensitivity of measurement and a wide measurement range. Alternatively, the immobilized partner molecules may be bound to support surfaces (e.g. glass beads, chromatographic stationary phases, microtitre plates, etc) by the usual techniques with F_c -part binding spacer molecules (in the usual method of immobilising antibodies in the field of environmental analysis).

Paper can also be used as a cheap support in a particular variant of the examples of implementation. Ordinary laboratory filter paper or cellulose-based membrane filters or other materials may be used for this purpose. Thin-layer chromatographic supports are also eminently suitable for this purpose, as they are easily modified on the surface. Thin-layer plates with or without background fluorescent labelling that have already been modified to a so-called reversed phase (RP-material) are a preferred form of implementation of this kind. Here, the oriented immobilisation of the partner molecules (i.e. that partner of the pair of complementary molecules which bind together that is not the analyte) is particularly successful if one or more long-chain aliphatic residues (C_6 - C_{25}) are synthesized on to these molecules in a controlled way opposite the epitope region, or, in the case of antibodies, if the F_{ab} fragments with the specific binding sites obtained by gene technology are made to produce lipophilic molecule groups on the opposite place of the molecule. The lipophilic residues of the molecules to be immobilized then penetrate into the aliphatic molecule brush of the support surface and so are fixed at very high density without impairing the binding properties. They can, however, be eluted as usual in chromatography after denaturation or deactivation, so that the support is available for immobilisation with fresh molecules. When thin-layer plates on an aluminium foil base are used, there is the elegant possibility of using the latter as counter electrode in electrochemical detection.

This process can also be dynamically automated within the framework of a flow-injection analysis, i.e. the molecules to be immobilized (without or with bound analyte molecules with label) are first applied to the unloaded RP-surface, rinsing is carried out to remove the excess in the case of unloaded molecules and the labelled analyte molecules are passed over the surface until saturation is reached. After further rinsing, the sample may be applied. The use

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of accessible flat surfaces for immobilisation of the partner molecules can save a process step, for in both versions (pre-immobilisation with labelled analyte molecules and competitive binding of labelled analyte molecules added with the sample) the amount of labelled analyte molecules bound can be determined easily both with the planar electrochemical cell (by simply pressing it on the surface) and by the optical fluorescence method without the use of an additional collecting surface.

In both methods of detection it is important that interfering substances are rinsed out from the sample matrix before the actual measurements. This is done with pure buffered electrolyte solution that both promotes the stability of the biomolecules and represents the base electrolyte for the electrochemical or optical method of detection.

The redox systems chosen for use in the invention are those that give the highest standard exchange current densities at the working electrode materials used (platinum, gold or another noble metal). Of all the possible redox systems, this preferably includes only those that are particularly reversible, such as those based on ferrocene, ruthenium complexes, hexacyanoferrate (II/III), iodine/iodide, etc. Especially advantageous redox systems have a redox potential close to that of oxygen, so that oxygen does not interfere and cyclic voltammetry can be carried out without the need for a stream of inert gas.

In regard to the electrochemical cell, it is also particularly advantageous to use a planar microelectrode array arrangement, as the advantages of ultramicroelectrodes are achieved when the diameters of the individual electrodes are $> 10 \text{ nm}$. These advantages are: redox steps instead of peaks in the voltammogram, reduction in the ratio of the capacitive current to the faradaic current, independence of stirring, practically consumption-free measurement even without using a cyclic voltage, etc.

A particularly advantageous class of molecules for the fluorescence labelling are large porphyrin rings or appropriate phthalocyanins [attached to] the bis-isothiocyanate derivative of 2-[4'-chloro-7'-(3''-ethyl-2''-benzothiazolinylyden)-3',5'-(1'''-propanediyl)-1',3',5'-heptatrien-1'-yl]-3-ethylbenzothiazolium bromide (see Figure 4). They can be excited by cheap long-wave monochromatic laser light sources free from extraneous light and produce fluorescence in a wavelength range in which there is practically no interference from other molecules. The use of laser diodes with corresponding IR-sensitive semiconductor detectors allows especially small measurement devices to be constructed (e.g. hand-held instruments).

The devices and procedures of the invention are explained in more detail by means of examples:

Example 1

Displacement of the labelled analyte molecule from the immunologically prepared surface zone by the unlabelled analyte molecules in the sample:

An advantageous form of implementation of the arrangement of the invention and of the process of the invention is based on a competitive reaction between labelled and unlabelled analyte molecules. In this case non-specific binding balances out, as it occurs equally in both cases. It is also desirable that the unlabelled analyte molecules have a slightly higher

THIS PAGE BLANK (USPTO)

binding constant than the labelled molecules, so as to displace them more effectively. This is the case as a rule, as covalent binding to a relatively large marker molecule weakens the antibody/antigen (or, more generally, molecule/complementary molecule) bond because the two molecules can no longer come optimally close to one another.

Human serum albumin (HSA) was chosen as model analyte in this example.

The corresponding antibody (anti-HSA) was used as immobilized partner molecule.

The anti-HSA antibodies were bound to the surface of Sepharose material of small particle size (150 nm) by known immobilisation techniques and coupled with fluorescence-labelled HSA. A europium chelate compound (BCPDA) was chosen as fluorescent molecule. It was possible to bind several fluorescent chelate complexes (20-30) covalently to one HSA macromolecule. The europium chelate compound was chosen in this example instead of the IR-emitting label, because the fluorescence that appears in this case decays much more slowly than that of the interfering sample matrix (protein molecules in the case of biological samples). The measurement was made at the end of a small column loaded with the Sepharose material and the labelled immuno complex. When unlabelled HSA was added, the HSA molecules with the fluorescent label displaced from the surface of the Sepharose particles loaded with HSA antibodies were measured in a through-flow cell. Light with a wavelength of 350 nm was used, the beam being chopped with an optical chopper with a frequency of 140 Hz. The fluorescent light was measured at right angles to the light used for excitation. A photomultiplier was used as light detector and a phase angle of 0° was set on the lock-in amplifier. Figure 5 shows the signals that can be measured on adding unlabelled HSA. They are proportional to the HSA concentration in the sample applied to the column. This measurement technique enables many more samples to be analysed per unit time than with photon counting, which is anyway closed to the FIA technique. Apart from HSA, it was possible to determine other analytes such as atrazine and other harmful substances in the sub ppm range with high precision by immobilising appropriate monoclonal or polyclonal antibodies.

Example 2

Electrochemical detection of redox-labelled analyte molecules:

Atrazine, which is environmentally relevant, was chosen as analyte. It was covalently bound to a modified ferrocene molecule in 6 steps by standard methods of organic synthesis. The highly reversible redox system chosen had first to be converted into a water-soluble form by attachment of strongly polar side chains. The individual steps in chemical synthesis, starting from the commercially available starting product, are shown in Figure 6.

After purification, the final compound, redox-labelled atrazine, was used in atrazine assays by both the displacement method and the competitive method. The corresponding antibodies have been described in the literature by Hock et al. (1, 2). Figure 7 shows cyclic voltammograms for this redox-labelled atrazine at extremely high dilution on a support surface. The direct contact between the redox system and the surface of the working electrode and the absence of any redox molecules diffusing towards or away from it means that the peaks in the cyclic voltammogram are sharper than usual. This effect also improves sensitivity.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 3

Increasing the limit of detection by repetitive electrochemical oxidation followed by reduction:

Hexacyanoferrate (II/III) in a ratio of about 1:1 was chosen as reversible redox system. The typical limit of detection for this system in classical cyclic voltammetry lies in the millimolar concentration range. The method of electronic signal averaging, which can be used here because the measurement technique does not involve consumption of the analyte, enables quantitative determination of extremely low redox concentrations far below the micromolar (mmol/L) range with a very good signal-to-noise ratio. For example, with a cycle frequency of about 1000 Hz, 1000 oxidation and reduction reactions can be carried out in a second, which is equivalent to a ten thousandfold higher redox concentration (compared to the usual operating frequency of 0.1 Hz) in regard to the electrochemical signal, or to a correspondingly higher electron transfer number, which would be equivalent to an analyte molecule to which a corresponding number of single-electron redox molecules were bound.

Example 4

Suppression of the capacitive component of the current in rapid cyclic voltammograms by application of cyclic averaging:

It is well known that at high rates of change of potential a so-called capacitive current arises due to the corresponding change in charge of the double-layer capacitance at the boundary of the working electrode. The magnitude of this current is unfortunately proportional to the rate of change, so that an extremely high cycling rate in cyclic voltammetry should actually be excluded because this component far outweighs the corresponding redox peak (faradaic current) and results in voltammograms like that shown in Figure 9. If, in contrast, with macro working electrodes the voltage coordinate values are fed into the individual digital channels of the averaging device or scan recorder counting backwards as with an X-Y recorder with this device, the reversal of the sign of the current on addition in any one channel (which is assigned to a quite specific working electrode potential) results in the balancing out of the capacitive component of current. This balancing out is almost complete, as at constant double-layer capacitance the capacitive current is proportional to the rate of change of potential dU/dt , ignoring the prefixed sign. Only the faradaic current peaks, which are proportional to the concentration of the redox system, are not balanced out by this trick of circuitry, as they occur at different potentials. This then gives a low-noise averaged cyclic voltammogram like that shown in Figure 8e. Working with potential cycle frequencies of well over 100 Hz is made possible only by an electronic device with this circuitry.

Example 5

Suppression of the capacitive component of the current by using an ultramicroelectrode array:

If the surface of the working electrode is reduced in size, the corresponding double-layer capacitance falls much more markedly than the faradaic current density, i.e. the ratio of the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

faradaic current (which is proportional to the analyte) to the capacitive current is greatly improved, so that extremely fast rates of change of potential of > 500 V/sec become possible. In addition, the change in the diffusion conditions for the electroactive species causes a change in the signal form. Ultramicroelectrodes (diameter < 10 μm) allow spherical diffusion conditions in contrast to the planar diffusion with macroelectrodes and transform so little of the substance that there is no depleted layer growing into the solution. This is reflected in the voltammogram by a clear step and a stable limiting current plateau. Figure 10 shows the difference between a cyclic voltammogram for a trace of a redox system with a macroelectrode and an ultramicroelectrode array with the geometry disclosed in Figure 3. The array has exactly the same characteristics as an individual ultramicroelectrode but has the advantage that the magnitude of the current is increased in accordance with the number of electrodes.

Example 6

Arrangement for an especially simple form of implementation:

It is preferable to use capillary forces instead of the forced flow obtained in a flow injection analysis. Other supports for the immobilized partner molecules, apart from those based on the principles of paper and thin-layer chromatography, can be used. A piece of chalk (or sintered glass/ ceramic material) in the shape of a column is one example of this. With hapten-like analytes, the antibody molecules are here saturated with the labelled analyte molecules before immobilisation on the surface of the chalk. Immobilisation can be effected by simply dipping in this solution, during which the path of run may be observed. The molecular associates are fixed to the surface or cross-linked with bifunctional reagents. A second collection zone for molecules is also established, separated from this primary immunological zone by an untreated flow zone. In the interests of high sensitivity, a narrow region right at the end of the chalk support suffices for this. In the example, the end surface has the same antibodies as were used in the primary immunological zone, the only difference being that here the analyte-selective binding sites are free, so that they collect the labelled analyte molecules released by the unlabelled analyte in the sample and concentrate them in an extremely small space. The electrochemical or fluorimetric measurement is then carried out on the polished end surface of the chalk column. The flow of a carrier electrolyte or of the sample due to the capillary forces is maintained by placing an absorbent plug on this end surface. The amount of sample measured must be found from the reduction in sample volume.

If a support (e.g. a column through which the sample flows, blotting paper, membrane filter, etc) to which a partner is bound is used in the invention, this partner is displaced by the unlabelled analyte in a competitive reaction. However, before it can leave the column and before the measurement, it is once more bound by immobilized complementary molecules and so accumulated for the actual measurement, while at the same time interfering substances can be removed by rinsing before the extremely sensitive electrochemical or optical measurement is carried out repetitively and the signal-to-noise ratio increased at will by signal averaging.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent claims

1. Process for carrying out especially sensitive immunoassays and other assays depending on molecule/receptor, DNA/complementary DNA strand and foreign molecule/host molecule interaction forces characterized by rapid and repetitive measurements of the current or of the fluorescent light and double measurements and comparison/determination of the ratio in at least two measurement zones or calibration analogous to the method of the internal standard, using stable redox or IR-fluorescence-labelled analyte molecules in immunoassays and similar assays.
2. Device [sic] in accordance with Claim 1 characterized in that the relevant partner of the highly selectively binding molecule pairs antibody (antibody fragment with binding site)/antigen, molecule/receptor, DNA strand/complementary DNA strand and foreign molecule/host molecule acting as the molecules or molecule associations recognising the analyte are distributed and immobilized on particular surfaces and in certain zones.
3. Device in accordance with Claim 2 characterized in that the partner molecule complementary to the analyte is immobilized in two separate zones of a stationary support, the molecules in the first zone being saturated with the redox- or fluorescence-labelled analyte molecule at the beginning of an analysis so that all binding sites are blocked and the labelled analyte molecules are displaced on contact with the unlabelled analyte molecules in the sample, the displaced labelled analyte molecules being collected again within as small a volume as possible at another place of the device before being subjected to repetitive electrochemical or optical measurement until the desired signal/noise ratio is attained.
4. Device in accordance with Claims 2 and 3 characterized in that, besides the displacement reaction, a competitive binding reaction may take place between the unlabelled analyte molecule in a sample and the redox- or fluorescence-labelled analyte molecule that must be added to every sample in a known ratio on partner molecules bound to the support, in which case the repetitive electrochemical or optical measurement can be carried out after the unbound molecules have been rinsed away and the sample matrix removed.
5. Device in accordance with Claims 2-4 characterized in that the complementary analyte-recognising molecules concerned are immobilized on support surfaces that permit the repetitive electrochemical or optical measurement, that is, that allow either intimate contact with a planar three-electrode electrochemical measurement cell or the measurement of the IR fluorescent light.
6. Device in accordance with Claims 2-5 characterized in that chromatographic stationary phases such as columns filled with adsorbent, RP-18-like materials, blotting paper strips, membrane filter strips based on cellulose and the like, which have capillary flow characteristics, are preferably used as support for the complementary molecules that recognise and selectively bind the analyte and are fixed in certain positions, besides the typical microtitre material polystyrene.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Device in accordance with Claims 2-6 characterized in that there is at least one primary immunological zone (or in general a zone where the analyte is specifically bound), perhaps along with a second collection and accumulation zone, on a path traversed by the sample (a kind of affinity chromatography miniature column).

8. Device in accordance with Claim 7 characterized in that the separation by affinity chromatography, displacement or competitive binding is either* effected in a planar manner, so that the planar three-electrode electrochemical measurement chain can have unimpeded contact with different surface zones and the optical measurement can also oscillate alternately between a support background and the measurement zones.

9. Device in accordance with Claim 7 characterized in that there are narrowly circumscribed zones as a collection and accumulation phase downstream of the primary immunogenic zone (as defined above) in the direction of flow of the sample, which consist of the complementary molecules that recognise and bind the analyte concerned, but which have free binding sites and capture the redox-active or fluorescent analyte molecules so collected for repetitive measurement.

10. Device in accordance with Claim 9 characterized in that the second collection and accumulation zone takes advantage of the lipophilic nature of the labelled analyte molecules by using a lipophilic zone with a surface saturated with oil or wax or RP-18 material instead of the appropriate complementary molecules, with a lipophilic counterion being added to this phase to form an ion pair in the case of an ionic analyte.

11. Device in accordance with Claim 9 characterized in that the collection and accumulation phase for the labelled analyte molecules displaced from the primary reaction zone takes the form of a dialysis membrane chosen according to the molar mass of the labelled analyte molecule positioned at a certain distance from the primary reaction zone, and on which it is possible to make electrochemical measurements both in position by means of connected electrodes and after dismantling.

12. Device in accordance with Claim 11 characterized in that this dialysis membrane also has the complementary molecules that bind the analyte immobilized on the first part of the surface relative to the direction of flow.

13. Device in accordance with Claim 9 characterized in that the collecting and accumulating zone is produced using heat and transporting gas to evaporate the solvent at the end of the path run by the sample.

14. Device in accordance with Claims 2-13 characterized in that the primary zone for the recognition and binding of the analyte and the separate collection and accumulation zone lie within a test-strip-like support with capillary forces, so that the transport of the liquid sample through the different zones can be effected by these forces without the need for an external pump, the evaluation being made with redundancy over sections with proportionality to concentration or with integral signals over the characteristic sections of the path. Here, the evaluation instrument is a scanner with optical or electrical measurement. In the case of electrochemical "scanning", cylindrical working electrodes are used.

* Translator's note: There is in fact no "or" in this sentence to introduce an alternative.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15. Device in accordance with Claims 2-14 characterized in that the measurement of the concentration of the redox-labelled analyte molecules on the appropriate surface zones of the device of the invention is effected by the electrochemical method of rapid cyclic voltammetry or some other method that works with no net turnover (consumption of substance), by means of a planar three-electrode measurement cell that is pressed on to these zones together with an appropriate base electrolyte (principle of the thin film measurement cell).

16. Device in accordance with Claim 15 characterized in that instead of a macro working electrode made of a noble metal such as platinum, gold or the like, the planar or quasi-planar three-electrode electrochemical measurement cell has an ultramicro electrode array of the same materials with diameters of the individual electrodes of $< 10 \text{ } \mu\text{m}$, so as to reduce the sharply rising capacitive current in the rapidly repeated cyclic voltammograms.

17. Device in accordance with Claim 15 and 16 characterized in that the working electrode or the ultramicro electrode array used for this purpose is integrated into the relevant zones of the assay.

18. Device in accordance with Claims 15-17 characterized in that the cyclic voltammogram with a high repetition rate in the range of 1 to $\gg 100 \text{ Hz}$ is recorded in an electronic averaging device rather than with the usual X-Y recorder, the averaging device being wired up so that the digitized current signals for both signs of potential are added in a single channel proportional to the potential, which, because of the different signs of the capacitive component of the current in the different directions of change, results in almost 100% compensation of this interfering non-faradaic current, while the concentration-dependent peak currents of the redox molecules appear at different potentials and so do not balance out.

19. Device in accordance with Claim 18 characterized in that the ultra-micro electrode array is used as working electrode.

20. Device in accordance with Claims 15-19 characterized in that the measurement procedure for an analyte is carried out automatically under computer control in such a way that both the amount of sample taken up by the apparatus and the collection time are kept to reproducibly and the repetitive electrochemical measurement is always carried out with the same number of addition cycles, depending on the signal/noise ratio.

21. Device in accordance with Claim 21 characterized in that redox systems with an especially high standard exchange current density that are soluble in the solvent concerned or in the sample matrix are used as redox labelling molecules that bind covalently with the analyte molecules.

22. Device in accordance with Claim 21 characterized in that water-soluble, stable and keepable ferrocene derivatives, ruthenium complexes, hydroquinones, hexacyanoferrate (II/III), iodine/iodide and the like that are linked to the analyte molecule via spacer molecules are used as especially reversible redox systems.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

23. Device in accordance with Claims 2-14 characterized in that the labelling molecules used for repetitive optical detection are special stable molecules that can be stored and absorb light of wavelength > 700 nm, re-emitting it as fluorescent light at longer wavelengths.

24. Device in accordance with Claim 23 characterized in that the bis-isothiocyanate derivative of 2-[4'-chloro-7'-(3''-ethyl-2''-benzothiazolinylyden)-3'-5'-(1'''-propanedyl)-1',3',5'-heptatrien-1'yl]-3-ethylbenzothiazolium bromide, porphyrin derivatives with large $2n + 1$ pi electron systems or phthalocyanins, which are characterized by particularly high extinction coefficients, are used as the molecule class for advantageous IR-fluorescence labelling.

25. Device in accordance with Claims 2-14 characterized in that the repetitive optical measurement fed to the averaging device is obtained by making alternating measurements on the fluorescent surface zone to be measured and on the support background at a position that is not covered with the collecting phase or the complementary molecules, which can be achieved by relative motion of the optical beam.

26. Device in accordance with Claims 2-14 characterized in that an intermittently operated laser diode in the IR wavelength region with high radiation density that is monochromatic and free from scattered light, together with a lock-in amplification technique, is used for optical excitation in place of a white light source with a monochromator.

27. Process for determining the concentration of one partner of a complementary pair of molecules that recognise one another selectively (antibody/antigen, receptor/receptor molecule, DNA sequence/complementary DNA strand, foreign molecule/host molecule) by an immunoassay in accordance with Claims 1-26 characterized in that redox- and fluorescence-labelled analyte molecules are used and the electrochemical or optical measurement of the distribution of these labelled molecules in the different zones of the test device is carried out without loss of material, so that any number of repeated measurements is possible.

28. Process in accordance with Claim 1 and 27 characterized in that the repetitive measurements are fed reproducibly to a signal averaging device so that the signal-to-noise ratio between the Faraday current and the background and between the surface with the fluorescent molecules and the free surface of the support is decisively improved.

Figure captions and legends

[to be read in conjunction with a copy of the original document]

Figure 1

Key to legend:

| | |
|---------------------|---|
| PROBE | = Sample |
| Säule/Kartusche etc | = Column/cartridge with polyclonal or monoclonal antibodies saturated with labelled analyte molecules |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| | |
|--|--|
| oszillierende Fluoreszenz-messung | = Oscillating fluorescence measurement |
| Anreicherungs-/Bindungszone | = Accumulation/binding zone |
| elektrochemische Planarzelle aufgepresst | = Planar electrochemical cell pressed on |
| Abfluss | = Effluent |

Figure 2

Key to legend:

| | |
|--------------------------------|--|
| Probe | = Sample |
| Antikörper (Fragmente) etc. | = Antibodies (fragments) saturated with labelled analyte molecules |
| Sammelzone etc. | = Collection zone (antibodies with free binding sites, lipophilic phase, etc.) |
| Transport durch Kapillarkräfte | = Transport by capillary forces |
| lipophile Phase etc. | = Lipophilic phase, dialysis membrane, etc. |
| Saugreservoir | = Absorbent reservoir |
| Abfluss | = Effluent |
| planarer Träger etc. | = Planar support (paper, membrane, thin-layer phase, etc.) |
| 1. Beisp. | = First example |
| 2. Beisp. | = Second example |
| Signal-intensität etc. | = Signal intensity against time or distance |
| Signal | = Signal |
| Integral = konzentrationsprop. | = Integral (proportional to concentration) |
| besser elektrochemisch messbar | = better measured electrochemically |
| Strecke 1 [2.] etc. | = Path, first [second] example above |

Figure 3

Key to legend:

| | |
|--------------------|-----------------------|
| Mikroelektroden | = Microelectrodes |
| Gegenelektroden | = Counterelectrodes |
| Referenz-elektrode | = Reference electrode |
| Wafer | = Wafer |

Figure 4 (top)

Fluorescence spectrum: [26] Porphyrin-(3.3.3.3)

Ordinate: Emission intensity (%)

Abcissa: Wavelength (nm)

Excitation wavelength: $\lambda = 546 \text{ nm}$

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 4 (bottom)

Fluorescence spectrum: [34] Porphyrin-(5.5.5.5)

Ordinate: Emission intensity (%)

Abscissa: Wavelength (nm)

Excitation wavelength: $\lambda = 578$ nm

Figure 6a

Synthesis of 3-ferrocenylpropionic acid

Figure 6b

Synthesis of amino-functionalized triazine derivatives

Figure 6c

Reaction of 3-ferrocenylpropionic acid with an amino-functionalized triazine to form a conjugate

Figure 7

Current intensity: 15 μ A/cm, scan rates:

A: 160 mV/sec

B: 80 mV/sec

C: 26.7 mV/sec

D: 13.3 mV/sec

Figures 8a, 8b, 8c, 8d, 8e

Method: Cyclic voltammetry

STROM = Current

SPANNUNG = Voltage

Umkehrpunkt der Spannung = Turning point of voltage

Figure 9

Ordinate: Current

Abscissa: Voltage

Figure 10, 10b

Ordinate: Current (μ A)

Abscissa: Voltage (V)

THIS PAGE BLANK (USPTO)